Nanoterapeutici za vaginalnu primjenu

Khaznadar, Farah

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:596828

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Farah Khaznadar

Nanoterapeutici za vaginalnu primjenu

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Oblikovanje lijekova 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Željke Vanić.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Željki Vanić na stručnom i savjesnom vođenju kroz proces izrade diplomskog rada.

Ovim putem želim se također zahvaliti i svim svojim kolegama, prijateljima te mojoj obitelji. Posebna zahvala roditeljima koji su sa svojom podrškom i ljubavlju uvijek bili uz mene.

SADRŽAJ

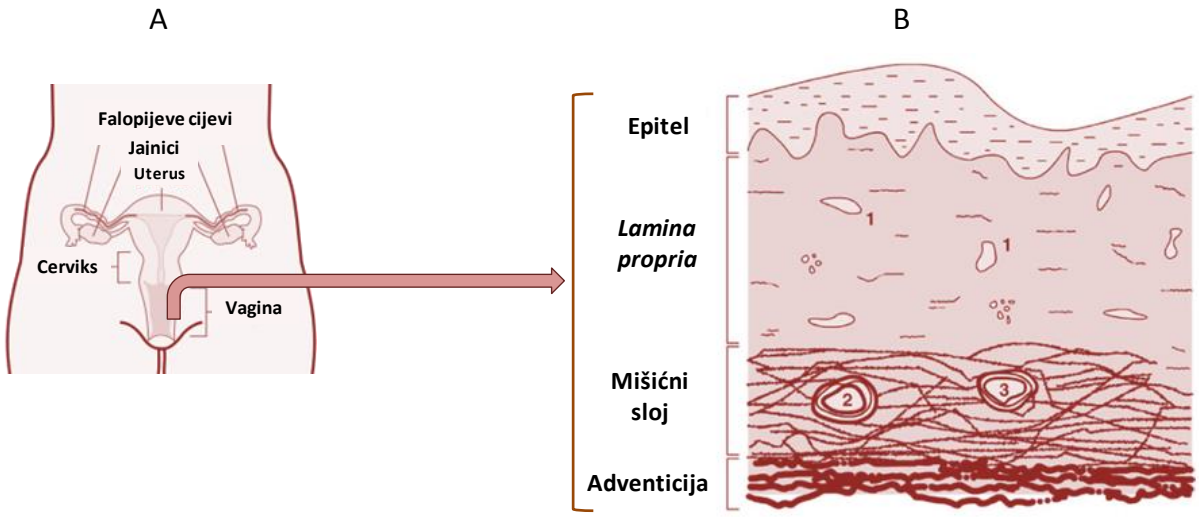
1. UVOD 1
1.1. ANATOMIJA, HISTOLOGIJA I FIZIOLOGIJA RODNICE 1
1.2. VAGINALNI PUT PRIMJENE LIJEKOVA 3
2. OBRAZLOŽENJE TEME 6
3. MATERIJALI I METODE 7
4. RASPRAVA 8
4.1. TERAPIJSKI NANOSUSTAVI ZA PRIMJENU NA SLUZNICE 8
4.1.1. Utjecaj fizičko-kemijskih svojstava nanosustava na ishod liječenja 9
4.1.2. Mukoadhezija 10
4.2. LIPOSOMI 10
4.2.1. Gljivične i bakterijske infekcije 11
4.2.2. Virusne infekcije 13
4.2.3. Novi izazovi i mogućnosti u vaginalnoj primjeni liposoma 14
4.2.4. Liposomi u gelu 15
4.3. NIOSOMI 16
4.4. DENDRIMERI 18
4.4.1. Gljivične i bakterijske infekcije 20
4.4.2. Virusne infekcije 20
4.5. CIKLODEKSTRINI 22
4.6. POLIMERNE MICELE 24
4.7. MIKROEMULZIJE 25
4.8. NANOČESTICE ZA POBOLJŠANU TOPIKALNU VAGINALNU DOSTAVU LIJEKOVA 27
4.8.1. Polimerne nanočestice 27
4.8.2. Čvrste lipidne nanočestice i nanostrukturirani lipidni nosači 29
4.8.3. Anorganske nanočestice 31
4.9. MUKOADHEZIVNI I MUKO-PENETRIRAJUĆI NANOSUSTAVI 32
5. ZAKLJUČCI 36
6. LITERATURA 37
7. SAŽETAK 48
8. SUMMARY 49

1. UVOD

1.1. ANATOMIJA, HISTOLOGIJA I FIZIOLOGIJA RODNICE

Rodnica (lat.vagina) je ženski spolni organ koji spaja cerviks uterusa i vestibulu vanjskih spolnih organa (Slika 1A). Cjevastog je oblika, elastične mišićne građe i duljine 6-10 cm (Kale i Ubgade, 2013).

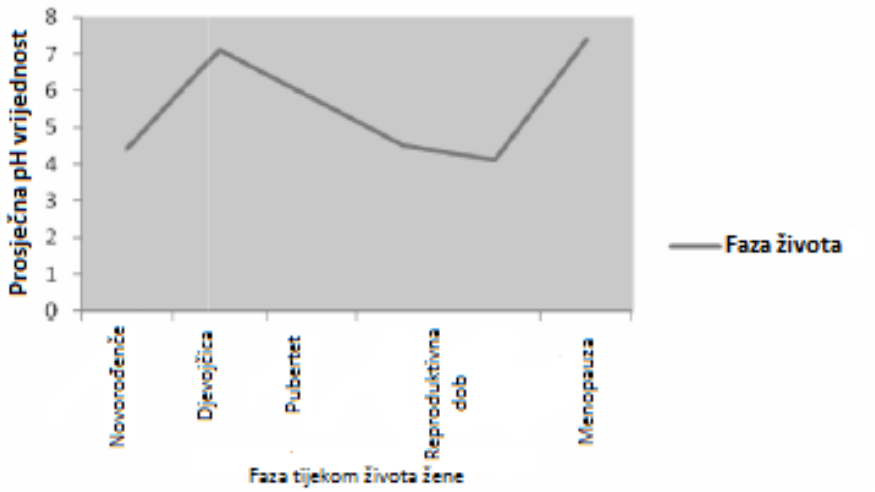
Rodnica je dio porođajnog kanala, odvodi menstruacijsku krv i cervikalnu sluz te štiti gornje dijelove spolnog sustava od infekcija. Površina rodnice je poprečno naborana (*rugae vaginales*) što značajno povećava površinu te na taj način pridonosi rastezljivosti i prilagodljivosti. Bogata je krvnim žilama (posebno venama), limfnim žilama i živcima te je histološki građena od četiri sloja (Slika 1B): slojevitog skvamoznog epitela, *laminae propriae*, mišićnog sloja i adventicije (das Neves i Bahia, 2006).



Slika 1. A - Ženski spolni organi, B - Histološka građa rodnice (poprečni presjek vaginalne stijenke) 1-kapilare, 2-arterija, 3-vena (Vanić i sur., 2014).

Rodnica nema sekretorne žlijezde već sadrži smjesu tekućina koja potječe iz različitih izvora čija je funkcija da onemogući sušenje i iritaciju sluznice. Tekućina (iscjedak) je mješavina izlučevina Skeneovih i Bartholinijevih žlijezda, cervikalne sluzi, odljuštenog vaginalnog epitela i transudata krvnih žila, ali i sekreta endometrija i Falopijevih cijevi zbog čega se stvara vlažan film na površini vaginalnog tkiva (Valenta, 2005).

Vrlo je važno naglasiti da se tijekom menstrualnog ciklusa pod utjecajem hormona mijenja debljina vaginalnog epitela, sastav i količina vaginalne tekućine što u konačnosti dovodi do promjena u volumenu i viskoznosti vaginalnog fluida (Valenta, 2005). Iako nije u potpunosti razjašnjeno što se sve od kemijskih komponenti nalazi u vaginalnoj tekućini, potvrđena je prisutnost ugljikohidrata, proteina, aminokiselina, alifatskih kiselina i imunoglobulina. pH vrijednost vaginalnog iscjetka mijenja se kroz različite faze života te je u zdravih žena fertilne dobi u rasponu od otprilike 3,8-4,2 (Slika 2). Za kiselu pH vrijednost je odgovorna mliječna kiselina koju stvaraju laktobacili *(Lactobacillus acidophilus*) razgradnjom glikogena iz odljuštenih epitelnih stanica. Uslijed menstrualnog krvarenja ili čestih spolnih odnosa (ejakulat je alkalnog pH) može doći do povišenja pH vrijednosti vaginalnog iscjetka. Nadalje, zbog prisutnosti velikog broja enzima (kisela fosfataza, beta-glukuronidaza, fosfoamidaza, sukcin-dehidrogenaza i dr.) te mikroflore (bakterije iz rodova *Lactobacillus* i *Bacteroides, Staphylococcus sp., Mycoplasma hominis*, gljivica *Candida albicans* i dr.) i njenih metabolita u vaginalnoj tekućini, može doći i do razgradnje lijeka, pogotovo onih peptidnog karaktera (Pavelić, 2005; Alexander i sur., 2004; Woolfson i sur., 2000).



Slika 2. pH-vrijednosti vaginalne tekućine tijekom različitih životnih faza (prilagođeno iz: Kale i Ubgade, 2013).

1.2. VAGINALNI PUT PRIMJENE LIJEKOVA

Vaginalni put primjene lijeka se istražuje već dugi niz godina za dopremu antimikrobnih lijekova, kontraceptiva, spermicida, prostaglandina i steroidnih hormona. Neki od razloga koji čine ovaj put primjene jedinstvenim su:

- Veoma dobra apsorpcija lijeka zbog velike površine i dobre prokrvljenosti sluznice
- Zaobilaženje prvog prolaska kroz jetru zbog čega se smanjuje mogućnost gubitka aktivnosti lijekova koji se metaboliziraju u jetri
- Izbjegavanje nuspojava lijeka (npr. gastrointestinalne smetnje) i evenutalne toksičnosti
- Jednostavna i bezbolna primjena
- Smanjen rizik od sekundarnih infekcija koji postoji kod parenteralne primjene lijeka (Ferguson i Rohan, 2011).

Od ljekovitog oblika namijenjenog lokalnoj terapiji vaginalnih oboljenja zahtjeva se da omogući dostatno zadržavanje lijeka na mjestu primjene i dopremu lijeka do mjesta djelovanja (obično površinske epitelne stanice), a od onog namijenjenog sistemskoj primjeni da omogući penetraciju lijeka kroz vaginalni epitel i apsorpciju u krv (Pavelić, 2005).

Vaginalno primijenjeni lijekovi mogu se apsorbirati transcelularno i paracelularno. Transcelularni put karakterističan je za lipofilne lijekove, a odvija se pasivnom difuzijom, preko membranskih proteina i endocitozom. Paracelularnim putem mogu se apsorbirati hidrofilni lijekovi male molekulske mase (Pavelić, 2005). Razvoj terapijskog sustava za vaginalnu primjenu je vrlo složen budući da je potrebno uzeti u obzir mnoštvo faktora koji mogu izravno ili neizravno utjecati na uspješnost dopreme lijeka (Tablica 1). Tijekom mjesečnog ciklusa, trudnoće te starenjem događaju se brojne fiziološke promjene: mijenja se debljina vaginalnog epitela, volumen, sastav i reološka svojstva vaginalne tekućine, što u konačnici utječe na bioraspoloživost lijekova. U razdoblju prije puberteta, debljina epitela vaginalne sluznice je tanka pa je i apsorpcija brža. Kod žene u reproduktivnom razdoblju je vaginalni epitel značajno zadebljan, dok je u doba menopauze smanjen i atrofiran (niska razina estrogena i progesterona). Osim toga, zbog niske razine estrogena u menopauzi, stvaranje glikogena je smanjeno što ima za posljedicu suhoću vaginalne sluznice, ali i povećanje pH vrijednosti (iznad 5) vaginalne tekućine čime se povećava rizik od infekcija. Takve fiziološke promjene mogu uzrokovati i promjene svojstava lijeka (npr. stupanj ionizacije lijeka), što može uzrokovati varijabilnosti u njegovoj apsorpciji i bioraspoloživosti (Alexander i sur., 2004).

Tablica 1. Parametri koji utječu na vaginalnu apsorpciju lijekova (Pavelić, 2005).

ŽIVOTNI CIKLUS	FIZIOLOŠKI PARAMETRI	FARMAKOLOŠKI PARAMETRI	FIZIČKO-KEMIJSKA SVOJSTVA LIJEKA
• dob (pubertet, reproduktivna dob, menopauza) •menstruacijski ciklus • trudnoća	• debljina epitela •vaginalna prokrvljenost • vaginalna sekrecija, (volumen, viskoznost, pH) • vaginalna mikroflora	•hormonska nadomjesna terapija	• molekularna masa • lipofilnost • ionizacija

Prilikom razvoja ljekovitog oblika za vaginalnu primjenu vrlo je bitno poznavati fizičko-kemijska svojstva lijeka poput lipofilnosti, molekulske mase, pKa vrijednosti, kemijske prirode spoja i površinskog naboja jer oni značajno utječu na vaginalnu apsorpciju.

Tako je, primjerice, vaginalna permeabilnost znatno veća za lipofilne steroide poput progesterona i estrona nego za hidrofilne steroide poput hidrokortizona i testosterona te kod ravnolančanih alifatskih alkohola raste ovisno o dužini pripadajućih alkilnih lanaca. Nadalje, općenito je prihvaćeno da se lipofilni lijekovi niske molekularne mase bolje apsorbiraju nego lipofilni ili hidrofilni lijekovi visoke molekularne mase. Nažalost, malo je podataka o utjecaju fizičko-kemijskih parametara lijeka (ljekovite tvari) na vaginalnu apsorpciju te je za svaku ljekovitu tvar i svaki ljekoviti oblik potrebno provesti detaljna pretklinička istraživanja (Ashok i sur., 2012).

Da bi bio učinkovit i za primjenu siguran, ljekoviti pripravak mora se dostatno zadržavati na sluznici i biti kompatibilan sa sluznicom. Primjerice, od vaginalnih mikrobicida se zahtijeva da ne mijenjaju vaginalnu floru, da su prikladnog (kiselog) pH (sličan vaginalnom) te da su odgovarajućih adhezivnih svojstava kao bi se mogli zadržati u rodnici barem nekoliko sati nakon aplikacije. Također je važno da mikrobicid pokazuje antivirusni učinak i nakon spolnog odnosa pa je idealno vrijeme zadržavanja mikrobicida između 4 i 8 sati. Mikrobicid se treba homogeno raspodijeliti i ne smije se nakupljati da se ne ošteti sluznica koja ima protektivnu ulogu. Pored toga, mikrobicid mora biti prihvatljive cijene kako bi većini populacije bio dostupan (Omar i Bergeron., 2011).

Konvencionalni ljekoviti oblici za vaginalnu primjenu (gelovi, kreme, tablete) kratko se zadržavaju na vaginalnoj sluznici te je time često puta onemogućeno postizanje

zadovoljavajućeg terapijskog učinka. S druge strane, ukoliko se ljekovita tvar brzo oslobađa iz pripravka namijenjenog lokalnoj terapiji, zbog dobre prokrvljenosti sluznice postoji opasnost od nepoželjnog sistemskog učinka. Spomenuti nedostaci klasičnih ljekovitih oblika mogu biti nadvladani primjenom terapijskih (nano)sustava koji bi omogućili kontinuirano, produljeno oslobađanje ljekovite tvari. Postupnim oslobađanjem lijeka iz nanosustava izbjegava se početna visoka lokalna koncentracija lijeka koja je primjerice, prisutna kod vaginalnih prstenova. Uklapanjem u nanosustave značajno se poboljšava topljivost teško topljivih lijekova. Osjetljivi lijekovi su zaštićeni unutar nanosustava od nepoželjnih učinaka iz okoline (enzimi), a uklapanjem lijekova koji inače izazivaju nepovoljne učinke na sluznici (kad su primijenjeni u klasičnom ljekovitom obliku) smanjuju se nepoželjni iritirajući učinci (Vanić i Škalko-Basnet, 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Razvoj učinkovitog terapijskog sustava za vaginalnu primjenu je od velikog medicinskog značaja. Spolno prenosive bolesti predstavljaju veliki problem u svijetu zbog sve veće učestalosti, a neke od njih su i smrtonosne. Unatoč postojanju velikog broja ljekovitih tvari prikladnih za vaginalnu terapiju, broj registriranih pripravaka je relativno mali. Zadnja dva desetljeća se sve više istražuje primjena nanoterapeutika kao nosača lijekova u vaginalnoj terapiji. Nanoterapeutici su sustavi veličine manje od 1 μm kod kojih je lijek uklopljen, dispergiran ili vezan za površinu. Većina istraživanja na području vaginalne primjene nanoterapeutika usmjerena je na liječenje vaginitisa i prevenciju spolno prenosivih bolesti, posebice infekcija humanim papiloma virusom (HPV) i virusom humane imunodeficijencije (HIV). Ovaj diplomski rad objedinjuje dosadašnja najvažnija znanstvena postignuća u razvoju terapijskih nanosustava za vaginalnu primjenu lijekova namijenjenih lokalnoj (topikalnoj) terapiji .

3. MATERIJALI I METODE

U izradi diplomskog rada korišteni su različiti preglednici znanstvene literature kao što su baze podataka *PubMed, Science direct, Scopus* te mrežne stranice sa srodnom tematikom. Literatura je pretražena prema ključnim riječima, temi i predmetu istraživanja te autorima i časopisima.

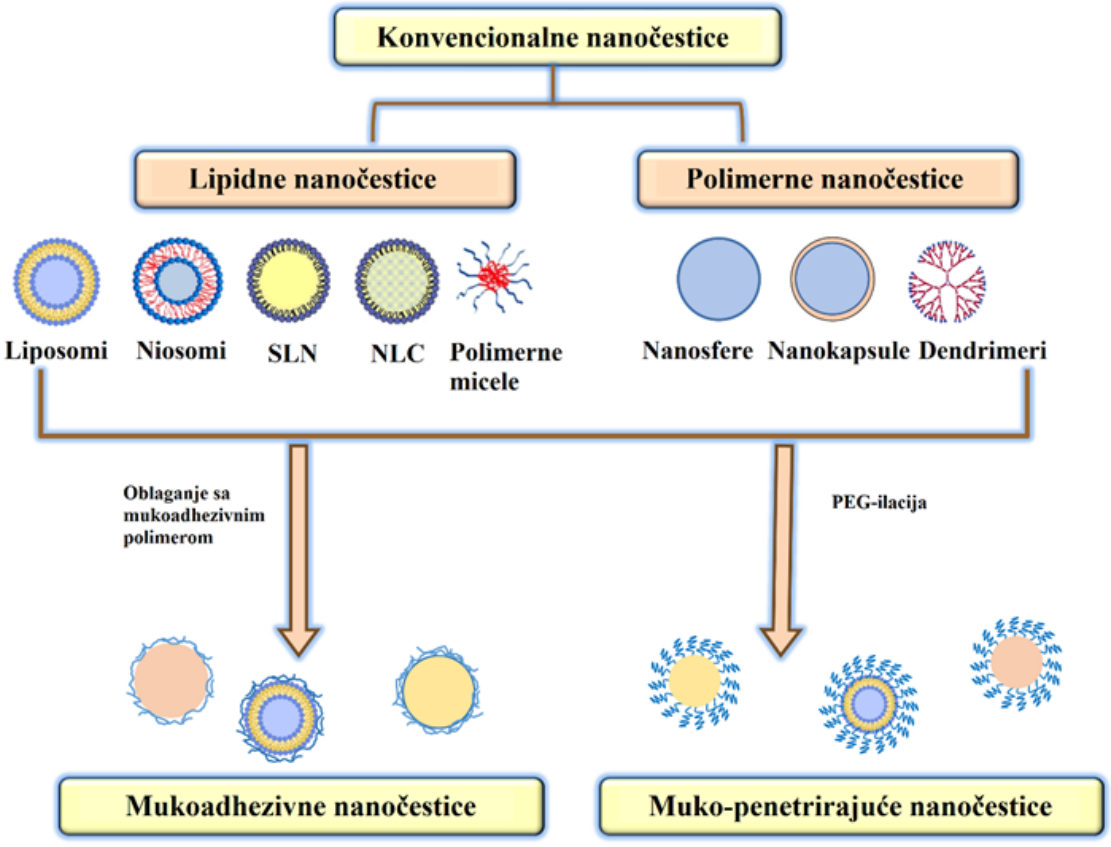
Znanstvena literatura proučavana je analitički i kritički, prvenstveno zbog definiranja znanstvenog i stručnog problema, te istraživanja postojećih znanja o temi koju obrađuje ovaj diplomski rad. Pri proučavanju relevantnih znanstvenih članaka izdvojeni su značajniji rezultati istraživanja, rasprave i zaključci. Pri pretraživanju znanstvene literature traženi su odgovori na specifična pitanja vezana za problematiku ovog diplomskog rada. Temeljem pregledane znanstvene literature izvedena su i neka vlastita razmatranja i zaključci prikazani u ovom diplomskom radu.

4. RASPRAVA

4.1. TERAPIJSKI NANOSUSTAVI ZA PRIMJENU NA SLUZNICE

Za poboljšanu dopremu lijekova preko sluznica intenzivno se istražuju različiti terapijski nanosustavi. Prema površinskim svojstvima, sposobnosti mukoadhezije ili mukopenetracije, dijele se u tri veće skupine (Slika 3):

a) Konvencionalni (ne-mukoadhezivni) nanosustavi
b) Mukoadhezivni nanosustavi
c) Muko-penetrirajući (PEG-ilirani) nanosustavi



Slika 3. Konvencionalni, mukoadhezivni i muko-penetrirajući nanosustavi za topikalnu dostavu lijeka. SLN-čvrste lipidne nanočestice; NLC-nanostrukturirani lipidni nosači (prilagođeno iz: Vanić i Škalko-Basnet, 2014).

Terapijski nanosustavi omogućuju odgođenu, kontroliranu ili ciljanu dostavu lijeka. Imaju sposobnost uklapanja različitih lijekova (hidrofilnih, lipofilnih i amfipatskih) te omogućuju

mijenjanje njihovih farmakokinetičkih svojstava. Brojni su načini kojima se pokušava poboljšati lokalna terapija korištenjem nanosustava, a neki od njih su: sprječavanje razgradnje lijeka, povećanje topljivosti teško topljivih supstancija te poboljšanje pemeabilnosti i transporta slabo permeabilnih lijekova (Vanić i Škalko-Basnet, 2014).

4.1.1. Utjecaj fizičko-kemijskih svojstava nanosustava na ishod liječenja

Uspješnost vaginalne dostave lijeka na željeno mjesto djelovanja ovisi o međusobno povezanim procesima koji uključuju:

a) raspodjelu i zadržavanje nanosustava na površini sluznice
b) penetraciju nanosustava kroz sluznicu ili
c) oslobađanje lijeka iz nanosustava i penetraciju kroz sluznicu

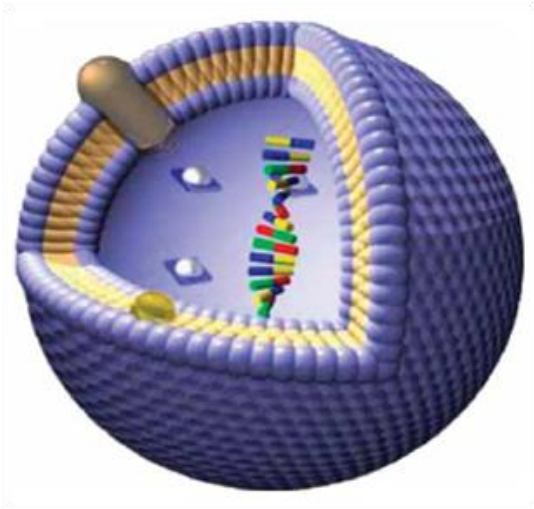
Navedene procese određuju fizičko-kemijska svojstva nanosustava koja uključuju veličinu čestica (srednji promjer), raspodjelu veličina čestica (indeks polidisperznosti), oblik, naboj na površini, elastičnost/rigidnost čestica te kemijska svojstva molekula na njihovoj površini. Uspješnost uklapanja lijeka, svojstva nanosustava (nanočestica), ali i koncentracija primijenjenih nanočestica (primijenjeni volumen) također određuju interakciju nanosustava sa sluznicom i utječu na ishod liječenja (Vanić i Škalko-Basnet, 2014). Struktura sluzi je složena jer ima brojne kanaliće (pore) ispunjene tekućinom čiju veličinu određuju vlakna mucina. Važno je u potpunosti razumjeti interakciju nanosustava sa sluzi i sluznicom kako bi se mogao razviti nanosustav za postizanje željenog terapijskog učinka (das Neves i sur., 2011a). Tako je primjerice utvrđeno da će se ovisno o naboju i kemijskim svojstvima molekula na površini nanosustava stvoriti odbojne ili privlačne sile između nanosustava i vlakana mucina. Nadalje, promjer čestica će odrediti da li će čestica ući u pore mucinske mreže i doći do željenog mjesta djelovanja. Dakle, glavni parametri koje je potrebno kontrolirati prilikom dizajniranja nanosustava su svojstva površine, veličina čestica i naboj na površini jer oni imaju ključnu ulogu u zadržavanju, raspodjeli (distribuciji) po površini sluznice i prolasku (penetraciji) kroz sluz (Vanić i Škalko-Basnet, 2014).

4.1.2. Mukoadhezija

Mukoadhezija se općenito može definirati kao „prijanjanje“ dviju površina od kojih je jedna sluznica kroz određeni vremenski period. Kratko vrijeme zadržavanja pripravka na sluznici, a time i ograničeni terapijski učinak lijeka nastoji se izbjeći razvojem mukoadhezivnih terapijskih (nano)sustava (Andrews i sur.., 2009; Peppas i Huang, 2004). Upravo će čvrst kontakt nanoterapeutika sa sluznicom omogućiti produljeno vrijeme zadržavanja i zaštitu nestabilnih lijekova a time i željeni terapijski učinak lijeka (das Neves i sur., 2011a; Andrews i sur., 2009). Mukoadhezivni nanosustavi su razvijeni dizajniranjem nanočestica koje se temelje na mukoadhezivnim polimerima ili modifikacijom površine ne-mukoadhezivnih (konvencionalnih) nanosustava kao što je prikazano na Slici 3 (Vanić i Škalko-Basnet, 2014). Međutim, posljednjih nekoliko godina znanstvena literatura donosi polemične prikaze o povoljnim i nepovoljnim učincima mukoadhezije. Naime, određena istraživanja su pokazala da mukoadhezivne čestice mogu uzrokovati značajno oštećenje sluznice te tako omogućiti stranim česticama, primjerice patogenima i drugim potencijalno toksičnim nanomaterijalima da lakše prođu mukoznu barijeru (das Neves i sur., 2011b; Wang i sur., 2011; McGill i Smyth, 2010). Nadalje, veoma je malo podataka o učincima dugotrajne vaginalne primjene mukoadhezivnih nanoterapeutika, pogotovo kad je riječ o kroničnim terapijima (Vanić i Škalko-Basnet, 2013).

4.2. LIPOSOMI

Liposomi su sferične vezikule građene iz fosfolipidnih dvoslojeva (membrana) koji okružuju unutarnju vodenu fazu. S obzirom na broj koncentrično položenih dvoslojeva, liposomi mogu biti unilamelarni liposomi (Slika 4), oligolamelarni (nekoliko fosfolipidnih dvoslojeva) ili multilamelarni (mnogo fosfolipidnih dvoslojeva). Promjer im je od 20-ak nm do 10- ak i više μm, a nastaju spontano, hidratacijom fosfolipida u vodenom mediju kako bi se smanjile nepovoljne interakcije između hidrofobnog dijela fosfolipida i molekula vode. Liposomi su vrlo poželjni kao nosači lijekova jer mogu uklopiti hidrofilne, hidrofobne i amfipatske ljekovite tvari (lijekove), a uz to su i fiziološki prihvatljivi (netoksični i neimunogeni) zbog sličnosti s biološkim membranama te biorazgradivosti (Mandić i sur., 2012).



Slika 4. Shematski prikaz uklapanja/ugradnje lijeka unutar liposoma. Hidrofilni lijekovi su smješteni u unutarnjoj vodenoj fazi, lipofilni unutar dvosloja, a makromolekule (proteini) kroz dvosloj (Vanić, 2012).

U usporedbi sa parenteralnom i dermalnom primjenom (70-tih i 80-tih godina) vaginalna primjena liposoma je prepoznata relativno kasno. Početna istraživanja koja će potaknuti ostale znanstvenike na bavljenje tim područjem, bila su tek u kasnim 90-im godinama prošlog stoljeća. Jain i sur. (1997) su predložili primjenu liposoma za intravaginalnu dostavu progesterona, a iste godine Foldvari i Moreland (1997) razvijaju i klinički vrednuju liposome s interferonom alfa za liječnje genitalnih infekcija čiji je uzročnik humani papiloma virus (HPV).

4.2.1. Gljivične i bakterijske infekcije

Vaginitis je jedno on najčešćih infektivnih oboljenja genitalnog sustava žena. Najčešći uzročnici vaginitisa su kandidijaza koju uzrokuje gljivica *Candida albicans* i bakterijska vaginoza (Kent, 1991). Statistički podaci upućuju da gotovo 75% žena barem jedanput tijekom života razvije vulvovaginalnu kandidijazu koja se često opetovano javlja tijekom života (njih 40-50% ponovno razvije ovo oboljenje) (Ning i sur., 2005b).
Uklapanjem antimikrobnih lijekova u liposome (i druge nanosustave) mogla bi se značajno poboljšati lokalna vaginalna terapija gljivičnih i bakterijskih infekcija jer bi se omogućile primjene nižih doza lijeka nego s konvencionalnim (klasičnim) oblicima (Vanić i Škalko-Basnet., 2013).

Pavelić i sur. (1999) su proveli ispitivanja s lecitinskim liposomima koji su sadržavali uklopljene antimikrobne lijekove: klotrimazol (antifungik), metronidazol i kloramfenikol (antibiotici). Budući je pH vaginalne sluznice relativno kiseo, a liposomi nestabilni u kiselom pH području, proveli su *in vitro* ispitivanja stabilnosti liposoma u medijima različitih pH vrijednosti: fosfatni pufer pH 4,5 (odgovara pH vrijednosti vaginalne sluznice žena reproduktivne dobi), pufer pH 5.5 (menopauza) i pufer pH 7.4 (kontrola). Udio oslobođenog lijeka iz liposoma ovisio je o pH ispitivanog medija i bio je najveći kad su ispitivanja provedena u puferu, pH 4.5. Pored *in vitro* ispitivanja, provedena su i *in situ* ispitivanja stabilnosti liposoma u prisutnosti kravlje vaginalne sluznice. Nakon 6 sati ispitivanja (37 °C) u liposomima je zadržano više od 40% originalno uklopljenog klotrimazola, 28% metronidazola te 37% kloramfenikola. U nastavku istraživanja su pripravili mukoadhezivne gelove pripravljene iz karbopola u koje su umiješali liposome s uklopljenim lijekovima. Istraživanja su pokazala produljeno vrijeme oslobađanja sva tri lijeka iz liposomalnih gelova u simuliranom vaginalnom mediju (Pavelić i sur., 2004a, 2005b). U drugom istraživanju, Ning i sur. (2005a, 2005b) su potvrdili produljeno oslobađanje klotrimazola iz liposoma namijenjenih vaginalnoj terapiji kandidijaze. Djelotvornost preparacije potvrđena je u antimikrobnim ispitivanjima zadovoljavajućim antifungalnim učinkom. Ispitivanja podnošljivosti preparacije na animalnom modelu pokazala su da primjena pripravka nije uzrokovala morfološke promjene vaginalne sluznice.

Kako bi se poboljšala vaginalna dostava lijeka putem liposoma, predložena su dva pristupa. Prvi se zasniva na korištenju deformabilnih (elastičnih) liposoma kako bi se poboljšala penetracija lijeka kroz sluznicu, dok se drugi temelji na produljenju vremena zadržavanja lijeka i nanosustava na sluznici. Postignuti su obećavajući rezultati na *in vitro* modelu epitelne barijere u vaginalnoj dostavi metronidazola. Deformabilni liposomi su značajno poboljšali penetraciju lijeka kroz ispitivani monosloj u usporedbi s konvencionalnim liposomima (Vanić i sur., 2013). Ispitivanja s mukoadhezivnim liposomima obloženim pektinom ili kitozanom pokazala su pozitivne rezultate u smislu boljeg zadržavanja nanosustava na sluznici i produljenom profilu oslobađanja lijeka (Vanić i Škalko-Basnet, 2014).

4.2.2. Virusne infekcije

Prevencija virusnih infekcija primjenom pripravaka mikrobicidnog karaktera od velikog je medicinskog značaja. Primjerice, procjenjuje se da je 2010-te godine u svijetu bilo zaraženo 33 miliona ljudi virusom humane imunodeficijencije (HIV). Vaginalna primjena mikrobicida je od iznimne važnosti jer bi se na taj način mogao značajno spriječiti prijenos virusa HIV-a tijekom spolnog odnosa. Budući da bi mikrobicidi uklopljeni u nanočestice trebali inhibirati virus na ulazu u vaginalnu sluz, na taj način bi se inhibirali svi slijedeći koraci koje dovode do infekcije domaćina, uključujući i replikaciju virusa. Posljedično, razvoj virusne rezistencije na lijek je gotovo onemogućen (Omar i Bergeron, 2011).
Foldvari i Moreland (1997) su u preliminarnim istraživanjima učinkovitosti liposoma za vaginalnu primjenu interferona α u liječenju infekcije humanim papilomavirusom (HPV) pokazali potpuno povlačenje cervikalnih lezija u žena i smanjen broj lezija u muškaraca. Ovaj rezultat je potvrdio veliki potencijal u primjeni liposoma za liječenje virusnih vaginalnih infekcija (Foldvari i Moreland, 1997).

MC-1220 je ne-nukleozidni inhibitor reverzne transkriptaze (NNRTI), visoke potentnosti ali je slabo topljiv u vodi zbog čega je potrebno razviti prikladnu formulaciju za vaginalnu primjenu. Mourtas i sur. (2010) su proveli *in vivo* ispitivanja podnošljivosti (test iritacije) liposomskog pripravka MC-1220 na animalnom modelu (zečevi). Rezultati istraživanja su pokazali da liposomski pripravak MC-1220 uzrokuje manju iritaciju od kontrolne formulacije (nonksinol-9) (Mourtas i sur., 2010). U drugom istraživanju na majmunima, liposomski pripravak MC-1220 je pokazao djelomičnu zaštitu od vaginalnog prijenosa virusa (Caron i sur., 2010).

Nadalje, napravljena je usporedba liposomske formulacije koja sadrži mikrobicid oktilglicerol (OG) i konvencionalne gel formulacije. Pronađena je veća učinkovitost liposomske formulacije oktilglicerola za HIV, *Herpes simplex virus* (HSV-1 i HSV-2) te za bakteriju *Neisseria gonorrhoeae* koja je trajala dulje od dva mjeseca. Toksikološka *ex vivo* ispitivanja na ljudskom ektocervikalnom tkivu ili *in vivo* na animalnom modelu (majmuni) nisu pokazala štetnost ispitivanog pripravka. Osim toga, pokazana je minimalna toksičnost liposomskog pripravka za vaginalnu mikofloru (laktobacile) (Wang i sur., 2012).

4.2.3. Novi izazovi i mogućnosti u vaginalnoj primjeni liposoma

Vaginalna primjena nukleinskih kiselina ima velikog potencijala u prevenciji i liječenju različitih virusnih infekcija poput AIDS-a, genitalnog herpesa te infekcija HPV-om (Cristofaro i Ramratnam, 2006).

Pristup utišavanja gena zahtijeva transport malih interferirajućih RNA (siRNA) molekula kroz mukoznu barijeru izbjegavajući brzu razgradnju nukleazom kako bi molekule stigle do epitelnih stanica (Wu i sur., 2011). Unatoč brojnim izvještajima kako se u normalnim fiziološkim uvjetima vaginalno primijenjeni konvencionalni lipopleksi mogu dopremiti do epitela, Wu i suradnici (2011) su to opovrgnuli. Naime, oni su razvili nove alginatne sustave koji sadrže muko-inertne PEG-ilirane lipoplekse koji su u *in vivo* ispitivanjima pokazali produljeno vrijeme zadržavanja i učinkovitu dostavu siRNA u vaginalni epitel te je tako po prvi puta razvijen fosfolipidni sustav za transmukoznu dostavu siRNA. Konvencionalni lipopleksi nisu uspjeli dostaviti nukleinske kiseline u vagnalno tkivo iako su manji od PEG-iliranih lipopleksa (Wu i sur., 2011). Godinu dana ranije, Lai i sur. (2010) su također došli do zaključka da veće ne-adhezivne čestice brže penetriraju kroz sluz od odgovarajućih manjih čestica.

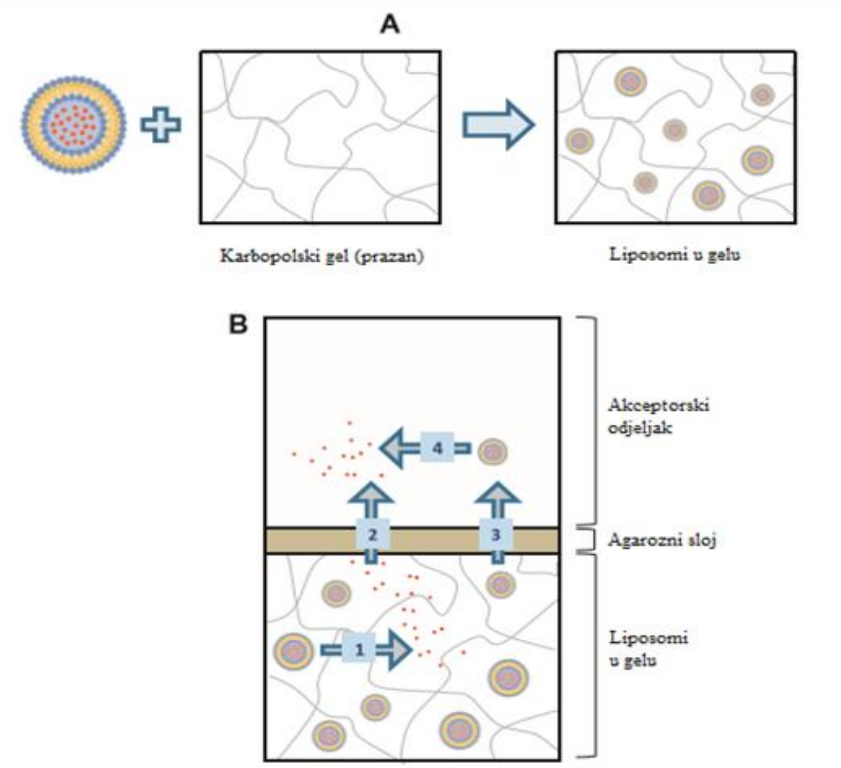
Dugotrajne, kronične vaginalne upale slabe imunitet i integritet sluznice čime se povećava rizik za prolaz patogena, pogotovo HPV virusa za kojega je dobro poznato da je uzrok razvoja tumora grlića maternice (Fichorova i sur., 2005; Coussens i Werb., 2002). Zanimljiv pristup u liječenju vaginalnih infekcija, posebno onih rezistentnih na klasične antimikrobne lijekove predstavlja primjena fitoterapeutika kao što je kurkumin jer ima protuupalno, antioksidativno, ali i antimikrobno i antifungalno djelovanje (Martins i sur., 2009). Međutim, zbog slabe topljivosti i biodostupnosti kurkumina i kurkuminoida primjena im je ograničena te ih je potrebno uklopiti u prikladne nosače, primjerice liposome. Ispitivanja na *in vitro* modelu su pokazala značajno bolje protuupalno i antioksidativno djelovanje liposomskih kurkuminoida od onih koji nisu bili uklopljeni u liposome (Basnet i sur., 2012).

Prema provedenim biofarmaceutskim ispitivanjima izvedeni su zaključci da na penetraciju liposomskog kurkumina kroz vaginalnu mukozu ne utječu transporteri ili metabolički enzimi, a glavni mehanizam je pasivna difuzija. Unatoč tome što je permeabilnost liposomskog kurkumina manja od permeabilnosti kurkumina u otopini, moguće je ostvariti relativno visoke doze kurkumina u vaginalnom tkivu sa ograničenom sistemskom apsorpcijom. To je zato što je vezanje liposomskog kurkumina za sluznicu veće što osigurava dobru apsorpciju u vaginalno tkivo (Berginc i sur., 2012).

4.2.4. Liposomi u gelu

Za postizanje željenog terapijskog učinka potrebno je osim dobrog uklapanja lijeka u nosače osigurati prikladnu viskoznost i stabilnost cijelog pripravka. Naime, liposomi se zbog tekuće prirode kratko vrijeme zadržavaju u rodnici zbog čega su istraživači nastojali pronaći odgovarajuću podlogu kako bi se osiguralo produljeno vrijeme zadržavanja liposoma. Pokazalo se da su hidrogelovi mukoadhezivnih svojstava pripravljeni iz metilceluloze i polimera akrilne kiseline (karbopola) prikladni kao podloge za uklapanje liposoma (Foldvari, 1996; Škalko i sur., 1998). Hidrogelovi su kao ljekoviti oblik kompatibilni sa vaginalnom sluznicom, imaju povoljan učinak i dobro se rasprostiru po površini. Često se koriste kao mikrobicidi jer stvaraju zaštitni sloj na površini vaginalne sluznice koji onemogućuje penetraciju patogena u sluznicu. Osim za vaginalnu dopremu mikrobicida, hidrogelovi se koriste za ovlaživanje vaginalne sluznice jer zbog visokog sadržavaja vode (> 80%) sprječavaju njezino isušivanje. Vaginalna suhoća nastaje uslijed hormonskih promjena u menopauzi koje se odražavaju u manjoj debljini vaginalnog epitela i slaboj produkciji sluzi (Vanić i sur., 2014). Posebice su prikladni hidrogelovi pripravljeni iz polimera akrilne kiseline jer djeluju na vaginalne infekcije formiranjem gela pri pH vrijednosti većoj od 4 i održavanjem pH na otprilike 4,5 jer blago kiseli pH pripravka (pH 4) potiče uspostavljanje prirodne mikroflore (Vanić i sur., 2014; das Neves i Bahia, 2006; Dittgen i sur., 1997).

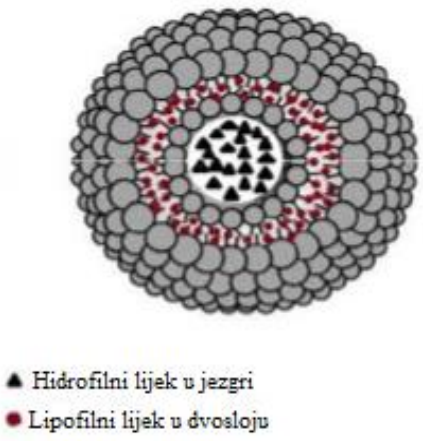
Umiješavanjem konvencionalnih liposoma s uklopljenim lijekovima (klotrimazolom, metronidazolom, kloramfenikolom ili aciklovirom) u karbopolske gelove povećana je stabilnost liposoma i ostvareno produljeno oslobađanje lijekova namijenjenih lokanoj vaginalnoj terapiji (Pavelić i sur., 2004a; 2004b; 2005a; 2005b). Produljeno i kontrolirano oslobađanje potvrđeno je i u ispitivanjima provedenim s liposomskim gelovima koji su sadržavali uklopljene hidrofilne fluorescentne markere različitih molekulskih masa (kalcein Mr 622,5; FITC-dekstrani Mr 4400 i 21200). Također se pokazalo da je oslobađanje markera iz liposoma uklopljenih u gel obrnuto proporcionalno molekulskoj masi markera. Model na kojem su provedena ispitivanja liposomskih gelova pružio je uvid u mogući mehanizam oslobađanja uklopljenog lijeka (markera) iz liposoma koji se temelji na 4 međusobno povezana procesa (Slika 5): oslobađanje lijeka iz liposoma u gel (1), difuzija oslobođenog lijeka iz gela u ispitivani medij (2), difuzija intaktnih liposoma s uklopljenim lijekom iz gela u ispitivani medij (3), oslobađanje lijeka iz intaktnih liposoma u ispitivanom mediju (4).



Slika 5. A: Liposomi uklopljeni u karbopolski gel; B: Mogući mehanizmi oslobađanja lijeka iz liposoma uklopljenih u hidrogel, 1-oslobađanje lijeka iz liposoma u gel, 2-difuzija lijeka kroz agarozni sloj u akceptorski odjeljak (ispitivani medij, umjetni vaginalni medij ili pufer), 3-difuzija intaktnih liposoma iz gela u akceptorski odjeljak, 4-oslobađanje lijeka iz liposoma unutar akceptorskog odjeljka (prilagođeno iz: Pavelić i sur., 2001, 2004b).

4.3. NIOSOMI

Niosomi su vezikule veoma nalik na liposome, ali umjesto fosfolipida u dvosloju sadrže neionske surfaktanate kao što su mono i dialkil poligliceril eteri ili polioksietilen glikoli koji su kemijski stabilniji i ekonomski pristupačniji od fosfolipida (Slika 6) (Sankhyan i Pawar, 2012; Patel i Patel, 2011). Niosomi mogu povećati topljivost teško topljivih lijekova te osigurati produljeno oslobađanje lijeka koji se primjenjuje vaginalnim putem. Veličinu i strukturne karakteristike niosoma moguće je mijenjati ovisno o svojstvima i veličini lijeka (supstancije) kojeg je potrebno uklopiti. Tako je primjerice, u niosome moguće uklopiti lijekove veoma male molekulske mase, ali i one velike poput peptida i nukleinskih kiselina. Premda su niosomi građeni od neionskih surfaktanata koji su prihvatljivi za humanu primjenu, u razvoju formulacije neophodno je provesti ispitivanja njihove biokompatibilnosti (Azeem i sur., 2009).



Slika 6. Shematski prikaz unilamelarnog niosoma (prilagođeno iz: Sankhyan i Pawar., 2012).

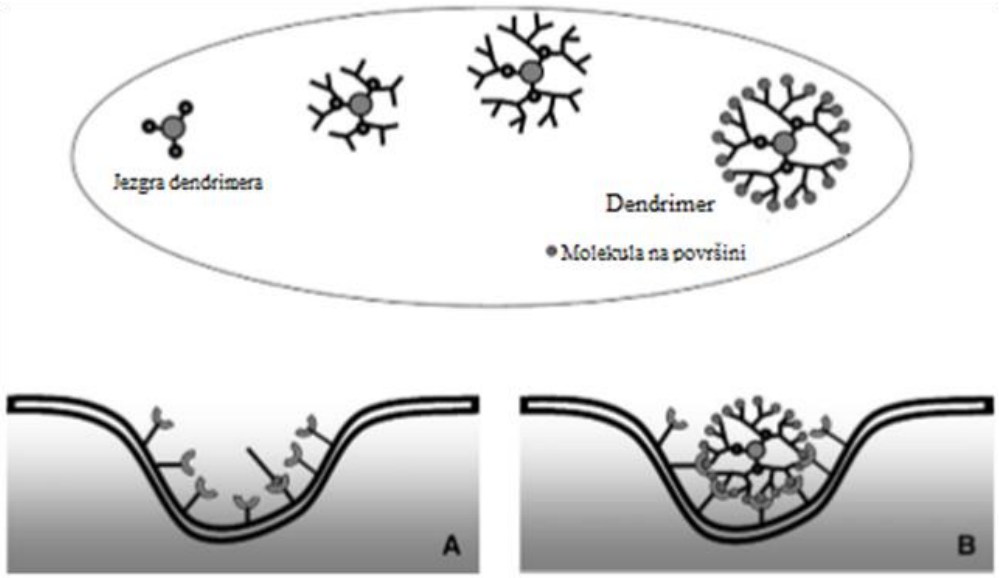
Ning i sur. (2005b) su proveli ispitivanja s karbopolskim hidrogelovima koji su sadržavali klotrimazol uklopljen u liposome, odnosno klotrimazol uklopljen u niosome. Dobiveni rezultati istraživanja su bili slični za liposome i niosome. Naime, oba pripravka su pokazala dobru podnošljivost te prikladnu učinkovitost uz mogućnost manje učestalog doziranja nego s konvencionalnim oblicima.

Niosomi također imaju potencijala za liječenje HIV-infekcija. Tenofovir dizoproksil fumarat (TDF) je nukleotidni inhibitor reverzne transkriptaze kojeg nije moguće primijeniti u obliku otopine ili gela jer uzrokuje eritem, atrofiju te infiltraciju leukocita na primijenjenom području. Uklapanjem lijeka u niosome je izbjegnuta iritacija i atrofija vaginalnog epitela štakora te se pripravak pokazao sigurnim i učinkovitim za vaginalnu primjenu. Naime, zbog postepenog oslobađanja lijeka iz vezikula izbjegnuta je visoka koncentracija lijeka na sluznici u kratkom vremenskom razdoblju (Patel i Patel, 2011).

Kish-Catalone i sur. (2007) su proveli *in vivo* ispitivanja mikrobicidnog učinka formulacije niosoma Novasome 7474 na majmunima. Niosomi s uklopljenim mikrobicidom 2-RANTES-om zaštitili su životinje od infekcije virusom CCR5- tropic $SHIV_{162P3}$ (engl. *simian/human immunodeficiency virus*). Međutim, zanimljivo je istaknuti da su i sami niosomi (bez uklopljenog mikrobicida) pokazali određeni mikrobicidni učinak. Naime, pretpostavlja se da je takav učinak posljedica interakcije membrane vezikula koja stvara barijeru između cervikovaginalnog epitela i virusa. Ovakvi rezultati, premda neočekivani, otvorili su nove mogućnosti u razvoju mikrobicidnih formulacija (Kish-Catalone i sur., 2007).

4.4. DENDRIMERI

Dendrimeri su nova vrsta polimernih nanočestica pravilno razgranate strukture, promjera 10 do 100 nm. Sintetiziraju se postupnim dodavanjem razgranatih podjedinica na reaktivnu jezgru što daje geometrijski gotovo savršen trodimenzionalni oblik (Bawarski i sur., 2008; Gong i sur., 2005). Na dendrimerima se razlikuju tri domene: multivalentna površina, unutarnje šupljine koje okružuju jezgru i mjesta na koje su dendroni spojeni (Svenson i Tomalia, 2005). Dendrimeri se razlikuju od ostalih nanočestica jer mogu ostvariti terapijski učinak i bez uklapanja ljekovite supstancije. Naime, izbor funkcionalnih grupa prisutnih na površini uglavnom određuje svojstva dendrimera zbog čega je moguće napraviti različite dendrimere (nove nanoterapeutike). Velik broj istraživanja je pokazao da dendrimeri imaju najveći potencijal kao mikrobicidi (Tablica 2). Većina dendrimera su poliamidoaminski (eng. *poly amido amine*, PAMAM) ili polipropileniminski (eng. *poli propilen imin*, PPI) dendrimeri (Rojo i Delgado, 2007). Zbog svoje građe i veličine dendrimeri se mogu istovremeno vezati na više receptora što može dovesti do poboljšanog ili novog biološkog učinka u odnosu na učinak male molekule koja se može vezati za samo jedan receptor (Slika 7) (Bawarski i sur., 2008).



Slika 7. Usporedba učinkovitosti dendrimera i male molekule. A) Mala molekula može aktivirati samo jedan receptor u biološkom sustavu. B) Dendrimeri mogu istovremeno aktivirati puno receptora te na taj način uzrokovati novi ili poboljšani učinak (Bawarski i sur., 2008).

Tablica 2. Dendrimeri u vaginalnom liječenju (Vanić i Škalko-Basnet, 2013).

Tip dendrimera	**Antimikrobni učinak**	**Tip ispitivanja**			**Literatura**
		In vitro	**Animalna**	**Humana**	
Jeffamines®	*Candida albicans*	x			Tulu i sur. (2009)
Kationski lipopeptidi	*Candida genus*	x			Janiszewska i sur. (2012)
SPL7013	HIV	x	x	x	McCarthy i sur. (2005)
	HIV, HSV	x			Gong i sur. (2005)
	HIV	x	Makaki		Jiang i sur. (2005)
	HIV, *Chlamydia*		Makaki		Patton i sur. (2006)
	HIV, HSV-2		Miševi		Tyssen i sur. (2010)
	HIV			Zdrave žene	O'Loughlin i sur. (2010)
	HIV			Zdrave žene	Cohen i sur. (2011)
	HIV, HSV-2			Zdrave žene	Price i sur. (2011)
	HSV	x	Miš		Bourne i sur. (2000)
	HSV-2	x	Miš, Gvinejska svinja		Bernstein i sur. (2003)
	HIV, HSV-2	x			Tyssen i sur. (2010)
	HIV, HSV-2			Zdrave žene	Price i sur. (2011)
	HIV			Zdravi muškarci	Chen i sur. (2009)
PEG-ilirani PAMAM	*Pseudomonas*	x			Calabretta i sur. (2007)
		x	Gvinejska svinja		Navath i sur. (2011)
PAMAM-derivat	bakterije		Gvinejska svinja		Wang i sur. (2010)
Peptidni derivat	HSV	x			Luganini i sur. (2011)
Anionski karbosilan	HIV	x	Zečevi		Chonco i sur. (2012)

engl. HIV= *Human immunodeficiency virus*; HSV= *Herpes simplex virus*; PAMAM=*poly(amidoamine)* (derivat dendrimera)

4.4.1. Gljivične i bakterijske infekcije

Nažalost, vrlo je malo podataka o djelovanju dendrimera na *Candidu albicans* te na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Tulu i sur. (2009) su usporedili antifungalnu aktivnost u vodi topljivih dendrimera sa aktivnošću antifungalnih lijekova nistatina, ketokonazola i klotrimazola u *in vitro* uvjetima. Ispitivanje je pokazalo da su dendrimeri jednako ili više učinkoviti. Nadalje, istraživanje u kojem su se lipidi uklopili u dendrimere je pokazalo da novi dendrimerni lipopeptidi imaju jaču antifungalnu aktivnost u odnosu na dendrimere bez lipida. Ovaj rezultat bi mogao biti vrlo koristan u daljnjem sintetiziranju dendrimera kao antimikotika (Janiszewska i sur., 2012).

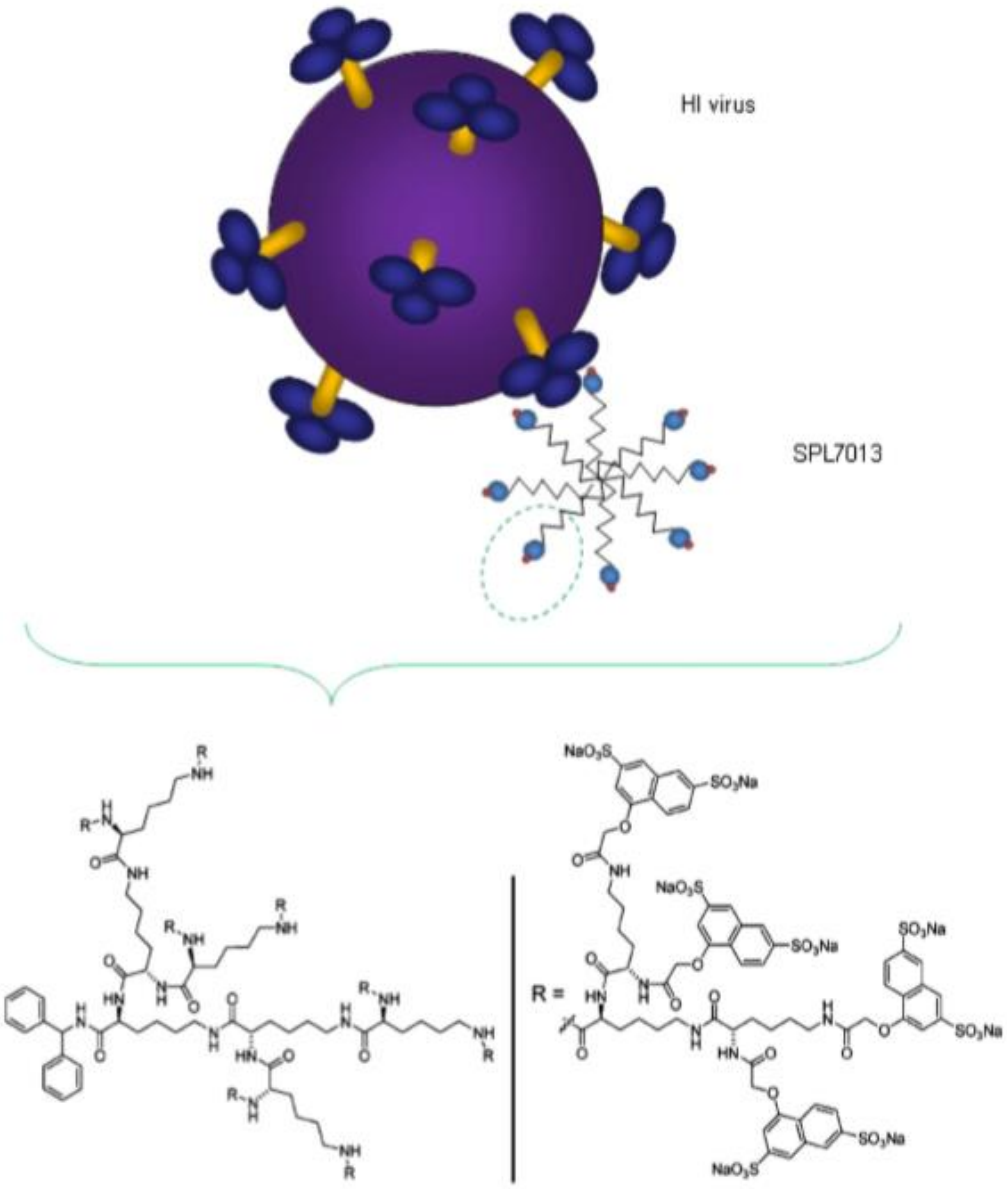
Glavni uzrok mortaliteta i morbiditeta u bolnicama diljem svijeta su još uvijek bakterijske infekcije. Kinoloni su potentni antibiotici koji bi mogli uspješno liječiti bakterijske infekcije, a trenutno su dostupni u obliku tableta i suspenzija za oralnu primjenu. Međutim, oralno primijenjeni kinoloni uzrokuju uglavnom gastrointestinalne nuspojave (povraćanje, mučninu, bol u trbuhu) koje je moguće izbjeći vaginalnim putem primjene. Kinoloni su slabo topljivi u vodi zbog čega je za učinkovitu vaginalnu primjenu potrebno povećati njihovu topljivost. Cheng i sur. (2007) su proveli istraživanje u kojem su ispitali učinkovitost PAMAM dendrimera kao nosača za nadifloksacin i prulifloksacin. Rezultati istraživanja su pokazali da je antimikrobna aktivnost gotovo jednaka aktivnosti samih lijekova što upućuje na to da su PAMAM dendrimeri dobri solubilizatori za kinolone. Jedno od istraživanja koje je pokazalo da sami dendrimeri mogu imati antimikrobni učinak proveli su Wang i sur. (2010). Pokazali su da bi topikalno primijenjen G4-PAMAAM-OH dendrimer (4.generacija neutralnog dendrimera) mogao uspješno liječiti infekcije maternice koju uzrokuje *Escherichia coli*.

4.4.2. Virusne infekcije

Najveće potencijale dendrimeri su pokazali u prevenciji virusnih infekcija. Naime, specifična struktura dendrimera omogućuje inhibiranje vezanja virusa za površinu stanice domaćina (prvi korak virusne infekcije) (Rosa Borges and Schengrund, 2005). Većina istraživanja dendrimera s antivirusnim učinkom usmjerena je na prevenciju HIV infekcija i razvoj mikrobicida za topikalnu primjenu (Rojo and Delgado, 2007). Zasad najbolji rezultati u području vaginalne primjene terapijskih nanosustava postignuti su sa dendrimerima (Rupp i sur., 2007).

SPL7013 (Mr 16,581 Da) je dendrimer koji ima polianionsku površinu, a razvila ga je Starpharma (Melbourne, Victoria, Australia). Zbog visokog površinskog naboja, SPL7013 se veže za gp120 proteine na površini HIV-a putem kojeg se virus veže za CD4 receptore na ljudskim stanicama. Na taj način je onemogućeno vezanje i /ili ulazak virusa u stanicu, odnosno infekcija HIV-om (Slika 8) (Rupp i sur., 2007).

VivaGel® je mukoadhezivni hidrogel koji se sastoji od 3% (m/m) SPL7013 u karbopolskom gelu. Adhezivna svojstva karbopola omogućuju zadržavanje pripravka na mjestu primjene kroz dulji vremenski period te osiguravaju uvjete za postizanje antivirusnog učinka SPL7013 dendrimera. Osim toga, blago kiseli pH gela puferira alkalni pH ejakulata i osigurava uvjete za održavanje prirodne mikroflore (laktobacili) (Mumper i sur., 2009; Rupp i sur., 2007). Kao kombinirani pripravak sa dvostrukom funkcijom (mikrobicidnom i protektivnom), VivaGel® je najperspektivniji mikrobicidni pripravak trenutno u fazi III kliničkih ispitivanja (Mumper i sur., 2009). Rezultati istraživanja su pokazali da zdrave, HIV-om nezaražene žene koje su primjenjivale VivaGel® jednom dnevno tijekom sedam dana nisu osjetile neugodne nuspojave (pečenje i bol genitalnom traktu) te da nije bilo sistemske apsorpcije i toksičnosti. Osim toga, nalazi kolposkopije nisu pokazali značajnu upalu ili oštećenje epitela (O'Loughlin i sur., 2010). Međutim, istraživanje provedeno na ženama iz Kenije i SAD-a u dobi od 18-24 godine koje su dva puta dnevno tijekom 14 dana primjenjivale VivaGel® ili placebo pripravak nije potvrdilo jednako dobre rezultate kao u prethodnom istraživanju. Naime, utvrđena je veća učestalost blagih iritacija i upala epitela u žena koje su primjenjivale VivaGel® (Cohen i sur., 2011). Iste godine, Price i sur. (2011) su ispitali mikrobicidnu aktivnost VivaGela® na HIV-1 i HSV-2. U provedenom ispitivanju, zdrave, nezaražene HIV-om, spolno neaktivne žene su primile svakih 5 dana (najmanje) po jednu dozu VivaGela®, ukupno 5 doza. Rezultati ispitivanja su pokazali da je HIV-1 i HSV-2 inhibitorna aktivnost bila prisutna najmanje 3 sata nakon primjene. VivaGel® se također trenutno istražuje u prevenciji HSV-2 infekcija (Vanić i Škalko-Basnet, 2013).

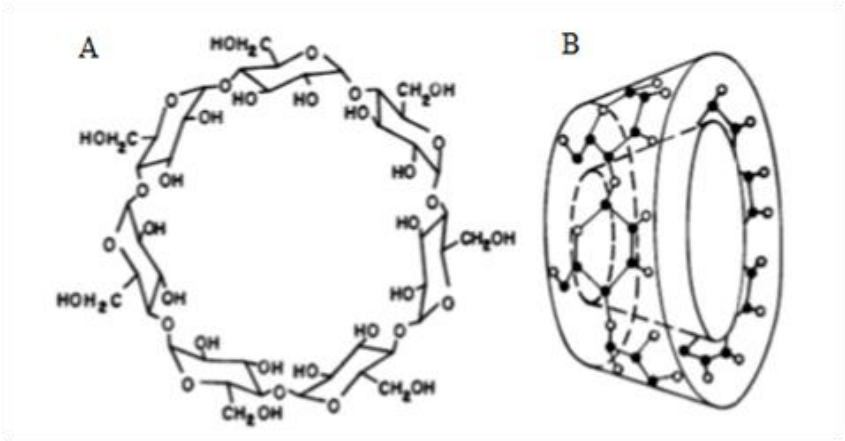


Slika 8. Shematski prikaz vezanja SPL7013 dendrimera za HIV i prikaz kemijske strukture SPL7013 (du Toit i sur., 2010).

4.5. CIKLODEKSTRINI

Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi građeni od najmanje šest D-(+)-glukopiranoznih jedinica povezanih sa α-(1-4) vezama (Slika 9A), a nastaju bakterijskom enzimatskom razgradnjom škroba (Cal i Centkowska, 2008; Yang i sur., 2008). Prirodni ciklodekstrini formiraju stabilne hidrate i dolaze u obliku bijelog kristalnog praška. Ciklodekstrini imaju relativno rigidnu strukturu u obliku krnjeg stošca jer nema slobodne rotacije veza između glukopiranoznih jedinica (Slika 9B). Površina ciklodekstrina je hidrofilna dok je unutrašnja

šupljina hidrofobna što omogućuje ciklodekstrinima stvaranje kompleksa sa velikim brojem lijekova. Međutim, zbog hidrofilnosti i velike molarne mase (>1000 Da) znanstvena literatura donosi polemične rezultate o mogućnosti prolaska ciklodekstrinskih kompleksa kroz biološke membrane (Cal i Centkowska, 2008).



Slika 9. Struktura (A) i oblik (B) β-ciklodekstrina (Cal i Centkowska, 2008).

Francois i sur. (2003) su proveli ispitivanja učinkovitosti mukoadhezivne vaginalne kreme s itrakonazolom uklopljenim u ciklodekstrine na animalnom modelu (zečevima). Rezultati su pokazali da je pripravak prikladan za liječenje vaginalne kandidijaze te da je unatoč produljenom zadržavanju unutar rodnice netoksičan. Nadalje, prema dobivenim rezultatima nije bilo značajnih nuspojava i sistemske apsorpcije što je posebno važno za sigurnu primjenu pripravka u trudnoći.

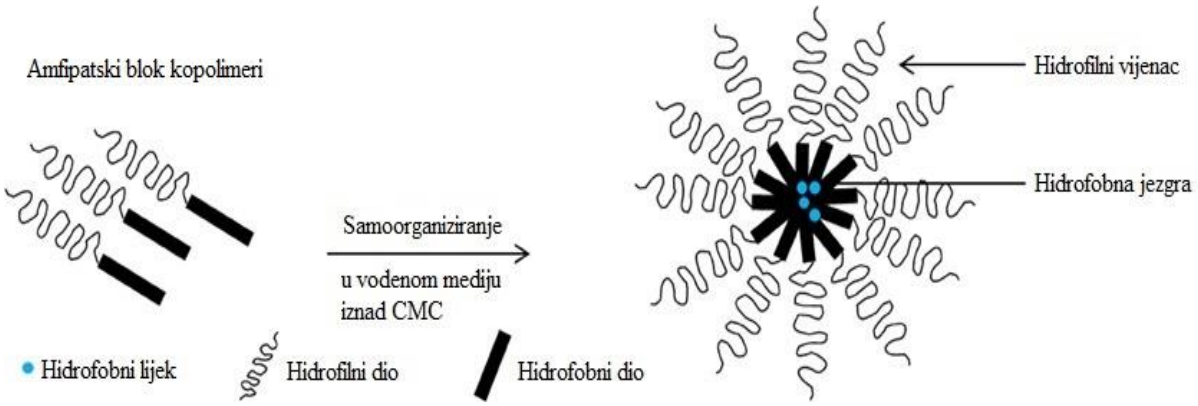
Osim liposoma i niosoma, ciklodekstrini su također istraživani za vaginalnu primjenu klotrimazola. Istraživanje u kojem je u mukoadhezivni, termosenzitivni vaginalni gel (priređen iz Pluronic-a F127®, Carbopol-a 934® i hidroetilceluloze) uklopljen β-ciklodekstrinski kompleks sa klotrimazolom, pokazalo je kontrolirano oslobađanje uklopljenog lijeka te prikladnu antifungalnu aktivnost tijekom duljeg vremenskog razdoblja. Takvi rezultati upućuju da bi ciklodekstrinski kompleksi sa klotrimazolom mogli biti učinkoviti nanosustavi u liječenju vaginalne kandidijaze (Bilensoy i sur., 2006).

Kao nosači lijekova koji modificiraju njihova svojstva (topljivost), ciklodekstrini imaju potencijala u antivirusnoj terapiji. Znanstvena literatura donosi pregled nekoliko radova koji pokazuju visoku učinkovitost UC781, ne-nukleozidnog inhibitora reverzne transkriptaze, u

inhibiciji HIV-a. UC781 je izrazito hidrofoban lijek te prema biofarmaceutskom klasifikacijskom sustavu pripada klasi II što znači da je niske topljivosti i da dobro prolazi kroz membrane. Zbog slabe topljivosti topikalno primijenjen UC781 ne može ostvariti svoj učinak (Yang i sur., 2008). Kako bi nadvladali ove nedostatke koji ograničavaju primjenu mikrobicida, Yang i sur. (2008) su proveli ispitivanja u kojima su uklopili UC781 u ciklodekstrine. Pokazali su da ciklodekstrini značajno povećavaju topljivost UC781 u vodenom mediju te da je inhibitorna aktivnost kompleksa ciklodekstrina i UC781 čak 30 puta veća u usporedbi sa aktivnosti samog UC781.

4.6. POLIMERNE MICELE

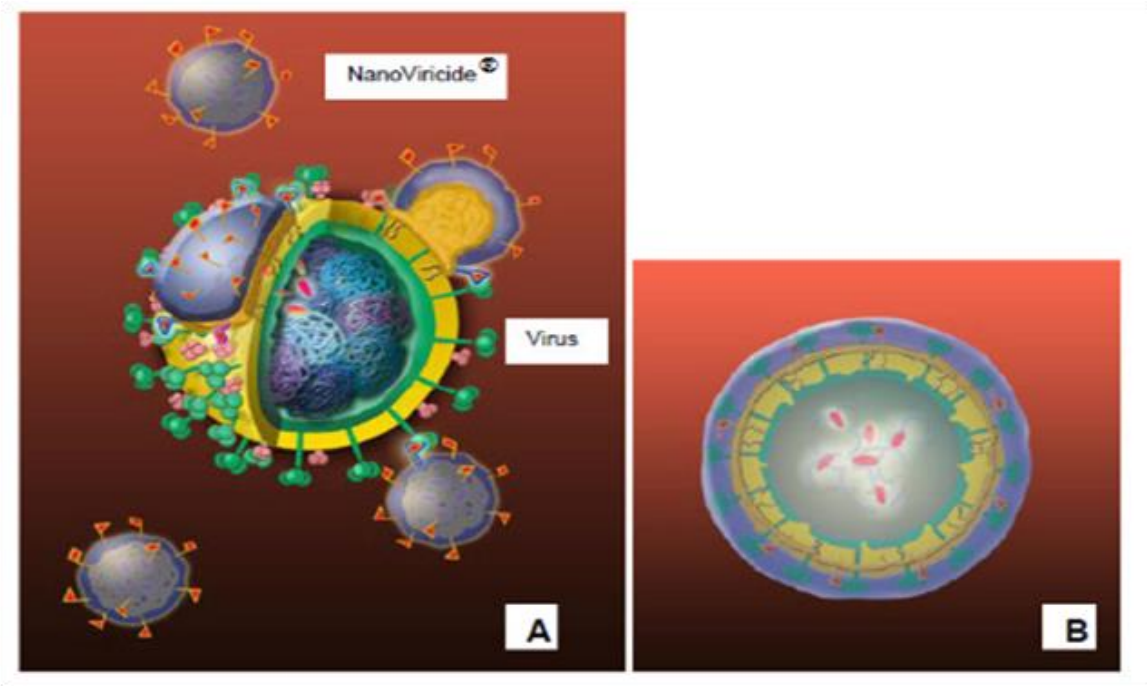
Polimerne micele su nanosustavi veličine znatno manje od 100 nm, a ovisno o tipu surfaktanta upotrebljenog za njihovu izradu mogu biti različitog oblika. Nastaju spontano samoorganiziranjem amfipatskih blok kopolimera u vodi (Slika 10). Zahvaljujući hidrofobnoj jezgri koju okružuje hidrofilni vijenac, moguće je uklopiti amfipatske i u vodi slabo topljive lijekove (Vanić i Škalko-Basnet, 2014; www.nanoviricides.com).



Slika 10. Stvaranje polimernih micela (prilagođeno iz: Jhaveri i Torchilin, 2014).

Nanoviricides® (NanoViricides Inc.) su polimerne micele koje se vežu za specifičnu vrstu virusa. Ligandi koji su kovalentno vezani za kemijski polimerni lanac određuju vrstu virusa na koji će se Nanoviricides® vezati (du Toit i sur., 2010). Glavne prednosti primjene ovog nanosustava su antiviralna učinkovitost i neškodljivost. Name, Nanoviricides® djeluje na viruse koji se ne nalaze u stanici, već u tjelesnim tekućinama zbog čega je smanjen rizik od štetnog

utjecaja na stanice domaćina, odnosno nuspojava. Ove polimerne micele se vežu na virus, okruže ga ili „progutaju“ zbog čega je njegova aktivnost potpuno zaustavljena (Slika 11). Za razliku od njih, inhibitori fuzije virusa sa stanicom domaćina i ulaza HIV-a u stanicu blokiraju tek nekoliko mjesta na virusu te je zbog preostalih neblokiranih mjesta on i dalje infektivan (www.nanoviricides.com). Slijedeći korak u inhibiciji virusa je njegova destabilizacija koja rezultira raspadom virusne čestice. Zbog takvog načina djelovanja Nanoviricides® osim HIV-a, ima velikog potencijala u prevenciji ostalih virusnih infekcija (du Toit i sur., 2010).

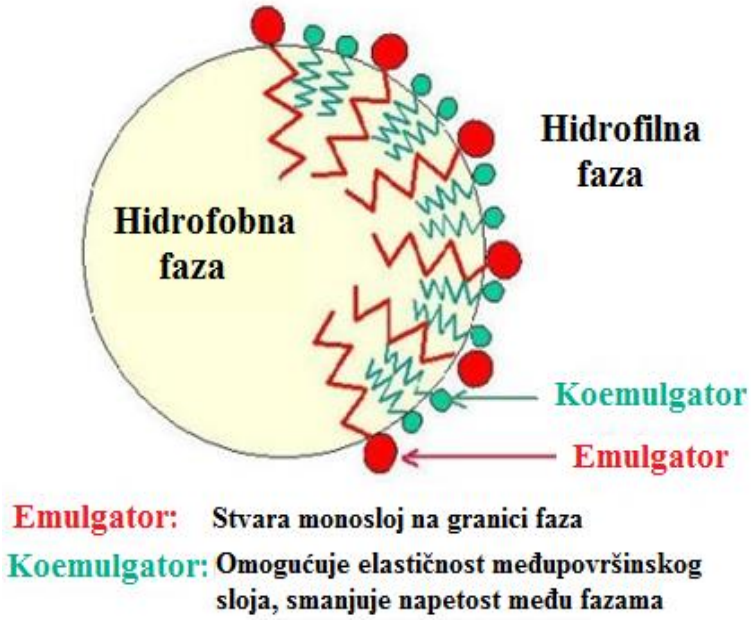


Slika 11. Mehanizam djelovanja Nanoviricid® micela na virus. A) Vezanje za virus na više različitih mjesta i početak njegovog proždiranja, B) Oblaganje i proždiranje virusa te njegov raspad i neutralizacija, spajanje sa virusnim lipidnim omotačem (www.nanoviricides.com).

4.7. MIKROEMULZIJE

Mikroemulzije su jednofazni, transparentni sustavi koji se sastoje od vode, ulja, emulgatora kojem može biti dodan još i koemulgator (Slika 12). Veličina čestica obično je manja od 200 nm, a mogu biti U/V i V/U tipa. Osim dobre stabilnosti, prednosti mikroemulzija se očituju u: sposobnosti solubilizacije lipofilnih lijekova, brzoj i učinkovitoj penetraciji lijeka, zaštiti lijeka od hidrolize i oksidacije te potrebnoj manjoj energiji za pripravu. Zbog navedenih prednosti mikroemulzije se istražuju za učinkovitu i sigurnu dopremu lijeka svim putevima primjene, pa tako i vaginalno (Devarajan i Ravichandran, 2011). Nedostatak mikroemulzija je tekuća priroda

koju je moguće izbjeći dodatkom različitih polimera i gelirajućih tvari (Vanić i Škalko-Basnet, 2014). Veće ograničenje mikroemulzija predstavlja velika količina surfaktanata zbog čega su neophodna ispitivanja biokompatibilnosti (Devarajan i Ravichandran, 2011).



Slika 12. Shematski prikaz U/V mikroemulzije (prilagođeno iz: www.quazoo.com).

Nonoksinol- 9 je po strukturi neionski surfaktant koji djeluje mikrobicidno i spermicidno ali pri citotoksičnim dozama zbog čega kroničnim izlaganjem uzrokuje vaginalne iritacije, ulceracije i infekcije. Kako bi pronašli sigurniji i učinkovitiji kontraceptiv s mikrobicidnim djelovanjem, D'Cruz i Uckun (2001) su pripravili gel mikroemulzije s nonoksinolom- 9. *In vivo* studija na zečevima je pokazala visoku kontracepcijsku učinkovitost gel-mikroemulzija u usporedbi sa standardnim gelom nonoksinola- 9. Rezultati istraživanja su pokazali da primjena gel-mikroemulzije ne uzrokuje upalu i oštećenje epitela zečeva (osjetljiviji na iritanse u odnosu na ljudski epitel). Dugotrajna primjena pripravka (13 dana) na drugom animalnom modelu (miševima) nije uzrokovala sistemsku, lokalnu ni reproduktivnu toksičnost. U drugom istraživanju, isti autori su pokazali prikladnost gel-mikroemulzija za vaginalnu primjenu teško topljivih (lipofilnih) lijekova poput zidovudina (D'Cruz i Uckun, 2001).

Bachhav i Patravale (2009) su razvili gel-mikroemulziju za vaginalnu primjenu klotrimazola te usporedili njezinu učinkovitost i stabilnost sa Candid-V® gelom, komercijalnim proizvodom koji sadrži klotrimazol. Istraživanja su pokazala jaču antifungalnu aktivnost i bioadheziju gel-mikroemulzije sa klotrimazolom te neočekivano znatno manju stabilnost pripravka (samo 3 mjeseca) u odnosu na Candid-V® gel. Na temelju daljnjih provedenih ispitivanja istraživači su

zaključili da bi razgradnju mogao uzrokovati kiseli pH gel-mikroemulzije. Njihovom zaključku ide u prilog činjenica da komercijalni Candid-V® gel ima pH 6,81 i stabilnost do 1.5 godine. Stoga su neophodna daljnja istraživanja u razvoju terapijski učinkovite i stabilne formulacije (Bachhav i Patravale, 2009).

4.8. NANOČESTICE ZA POBOLJŠANU TOPIKALNU VAGINALNU DOSTAVU LIJEKOVA

Nanočestice su čvrste koloidne čestice (< 500 nm) koje karakterizira visoka stabilnost i mogućnost uklapanja širokog spektra lijekova (hidrofilnih, lipofilnih i amfipatskih). Ljekovite tvari (lijekovi) mogu biti dispergirane u polimernom matriksu (nanosfere) ili koncentrirane u jezgri obloženoj polimernom ovojnicom (nanokapsule) (Mohanraj i Chen, 2006). Mijenjanjem površinskih svojstava (oblaganjem s polimerima), veličine i naboja nanočestica moguće je povećati učinkovitost lijekova s uskom terapijskom širinom ili niskom bioraspoloživosti (Li and Huang, 2008). Za poboljšanu vaginalnu dopremu lijeka se istražuju različite vrste nanočestica koje se klasificiraju kao: polimerne (sintetske ili prirodne), lipidne (čvrste lipidne nanočestice i nanostrukturirani lipidni nosači) i anorganske nanočestice (Vanić i Škalko-Basnet, 2013).

4.8.1. Polimerne nanočestice

Polimerne nanočestice su stabilne, netoksične, biorazgradive te ne uzrokuju imunološku reakciju, upalu, trombozu i aktivaciju neutrofila (Kumari i sur., 2010). Kako bi se smanjila citotoksičnost i povećala fiziološka podnošljivost, napravljene su od prirodnih ili sintetskih polimera dobre biokompatibilnosti. Jedini sintetski polimeri odobreni od FDA (engl. *Food and Drug Administration*) su: polimliječna kiselina (eng. *poly-D,L-lactic acid*, PLA), kopolimer mliječne i glikolne kiseline (eng. *poly(lactic-co-glycolic acid*, PLGA), poliglikolna kiselina (eng. *polyglycolic acid*, PGA), polimetilmetakrilati (eng. poly(methylmethacrylate, PMM)) i polikaprolakton (poly-e-caprolactone, PCL) (Lembo and Cavalli, 2010). Većina polimernih nanočestica istraživana za vaginalnu primjenu je u području dostave mikrobicida i siRNA (Tablica 3).

Tablica 3. Nanočestice istraživane za topikalnu vaginalnu primjenu (Vanić i Škalko-Basnet, 2014).

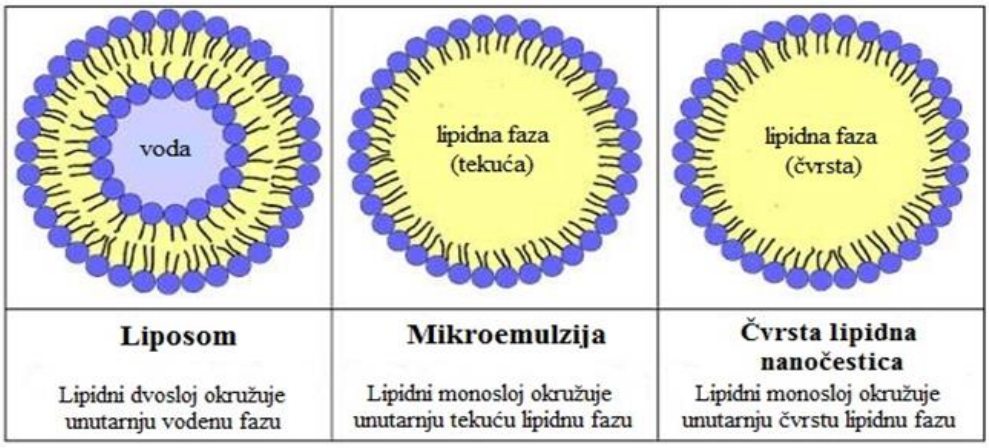
Polimer	**Djelatna tvar**	**Tip nanočestica**	**Ispitivanja**	**Rezultati**	**Literatura**
PLGA	SiRNA	Konvencionalne nanočestice	*In vitro, in vivo* (životinje)	Kontrolirano oslobađanje siRNA, učinkovita zaštita od HSV-2 infekcije kod miša.	Steinbach i sur.,2012; Woodrow i sur., 2009
	PSC-RANTES	Konvencionalne nanočestice	*In vitro, ex vivo*	Povećan ulazak u tkivo, poboljšana penetracija i lokalizacija.	Ham i sur., 2009
PEG-PLGA	Aciklovir	Muko-penetrirajuće	*In vitro, in vivo* (životinje)	Dobra penetracija kroz sluz, poboljšana vaginalna raspodjela i zadržavanje lijeka, učinkovita zaštita od vaginalne HSV-2 infekcije.	Ensign i sur., 2012b
Kitozan	Tenofovir	Mukoadhezivne	*In vitro*	Relativno velike nanočestice od kitozana pokazale su se kao sigurne za kontroliranu dostavu mikrobicida.	Meng i sur., 2011
Eudragit	Markeri	Mukoadhezivne	*In vitro*	Poboljšana doprema u stanice.	Yoo i sur., 2011
PEO-PCL, SLS-PCL, CTAB-PCL	Dapivarin	S modificiranom površinom	*In vitro*, permeabilnnost, citotoksičnost	Produljeno zadržavanje lijeka u tkivu u usporedbi sa slobodnim lijekom.	das Neves i sur., 2014b., 2013., 2012.
PEO-PCL	Dapivarin	Muko-penetrirajuće	*in vivo* (životinje)	Dobra raspodjela nanočestica unutar rodnice i donjeg dijela maternice. Postignuta je viša lokalna razina	Das Neves i sur., 2014a.

				te smanjena sistemska apsorpcija lijeka.	
PLGA, Pluronic F127-PLGA	Paklitaksel	Konvencionalne, muko-penetrirajuće	*in vivo* (životinje)	Muko-penetrirajuće nanočestice su zaustavile rast tumora i produljile preživljenje miša u usporedbi sa slobodnim paklitakselom ili PLGA- paklitakselom.	Yang i sur., 2014.

engl. CTAB= *cetyl trimethylammonium bromide*; HSV-2= *herpes simplex virus type 2*; PCL= *poly(ε-caprolactone);* PEG= *poly(ethylene glycol)*; PEO= *poly(ethylene oxide)*; PLGA= *poly(lactic-co-glycolic acid)*; siRNA= *short interfering RNA*; SLS= *sodium lauryl sulfate*.

4.8.2. Čvrste lipidne nanočestice i nanostrukturirani lipidni nosači

Čvrste lipidne nanočestice predstavljaju alternativu nano- i mikro-emulzijama (Slika 13) od kojih se razlikuju po tome što umjesto tekućih lipida sadrže čvrste lipide stabilizirane surfaktantima. U čvrstom su stanju na sobnoj temperaturi, a lijek je imobiliziran unutar čestica pa se zbog toga sporije oslobađa (Mehnert i Mäder, 2001).



Slika 13. Usporedba građe liposoma, čestica mikroemulzije i čvrstih lipidnih nanočestica (prilagođeno iz: www.intechopen.com).

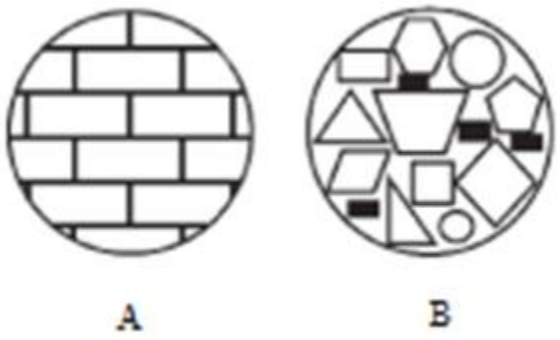
Čvrste lipidne nanočestice predstavljaju prvu generaciju lipidnih nanočestica (Slika 14A). Udio čvrstih lipida (pročišćeni trigliceridi, kompleksne smjese glicerida i voskova) se kreće do 30%, a surfaktanata do 5%. Budući da tijekom uskladištenja pripravka zbog pravilnog slaganja čvrstih lipida može doći do potiskivanja uklopljenog lijeka iz nanočestica razvijena je druga

generacija lipidnih nanočestica, tzv. nanostrukturirani lipidni nosači (Slika 14B). Umjesto čvrstih lipida sadrže smjesu čvrstih i tekućih lipida u omjerima od 70 : 30 pa sve do 99 : 1 (čvrsti : tekući lipidi). Takva struktura jezgri nanostrukturiranih lipidnih nosača omogućuje bolje uklapanje lijeka i veću stabilnost nanočestica tijekom uskladištenja (Müller i sur., 2007).

Oba tipa lipidnih nanočestica se najvećim dijelom istražuju u dermatologiji, ali imaju potencijala i u topikalnoj vaginalnoj terapiji. Zasad je svega nekoliko radova koji o tome svjedoče (Müller i sur., 2007).

Alukda i suradnici (2011) su proveli *in vitro* ispitivanje sa čvrstim lipidnim nanočesticama sa polilizinom i heparinom za vaginalnu dostavu antivirotika tenofovira. Ispitivanja su pokazala nisku citotoksičnost pripravka na vaginalnoj sluznici u usporedbi s čistim lijekom.

Istraživanje nanostrukturiranih lipidnih nosača sa klotrimazolom inkorporiranim u Poloxamer P407 gel je pokazalo vrlo dobre rezultate i prikladnost sustava za lokalno liječenje gljivičnih vaginalnih infekcija. Citotoksičnost pripravka bila je vrlo niska, a antifungalna aktivnost pripravka bila je četiri puta veća u usporedbi s komercijalnim proizvodom za liječenje kandidijaze (Ravani i sur., 2013).

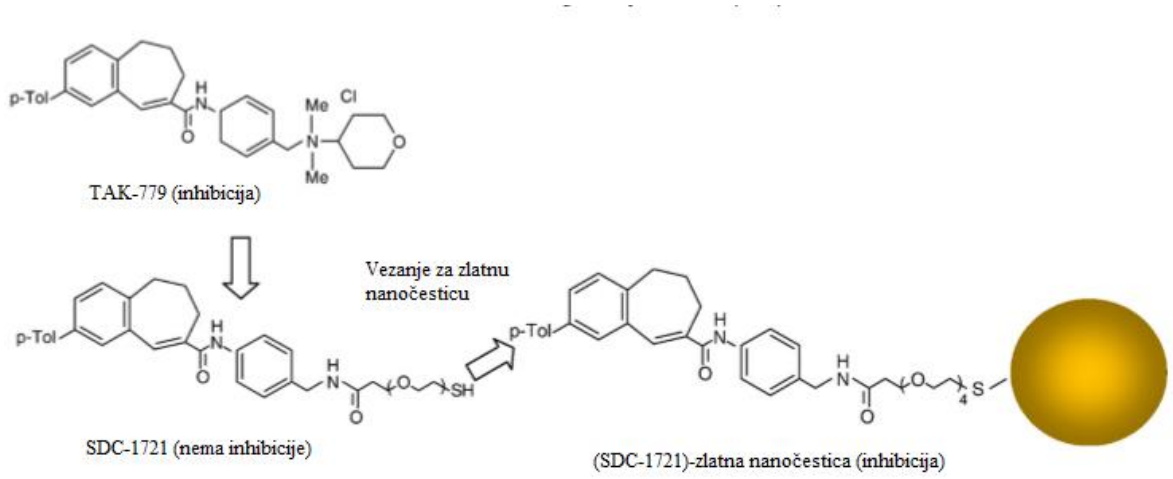


Slika 14. Shematski prikaz A) čvrste lipidne nanočestice, B) nanostrukturirani lipidni nosači (Harms i Müller-Goymann, 2011).

4.8.3. Anorganske nanočestice

Anorganske nanočestice su vrlo male čestice, veličine obično ispod 20 nm, čija je površina građena od anorganskih oksida. Modifikacijom i vezanjem različitih funkcionalnih grupa na površinu moguće je mijenjati oblik, veličinu, topljivost i stabilnost anorganskih nanočestica. (Mahajan i sur., 2012).

Bowman i sur. (2008) su prvi istražili primjenu zlatnih nanočestica u inhibiciji fuzije HIV-a. Istraživanjem odnosa strukture i aktivnosti TAK-779-a (CCR5 antagonist), pokazali su da je za visok afinitet vezanja i učinkovitu inhibiciju fuzije HIV-a odgovorna kvarterna amonijeva sol prisutna u njegovoj strukturi. Međutim, kvarterna amonijeva sol uzrokuje značajnu iritaciju na mjestu primjene zbog čega TAK-779 ima loša farmakološka svojstva (Barbaro i sur., 2005). Zbog toga su istraživači razvili SDC-1721, fragment TAK-a 779 koji nema kvarternu amonijevu skupinu. SDC-1721 nema inhibitorni učinak na HIV, ali vezanjem SDC-1721 za zlatne nanočestice obložene merkaptobenzojevom kiselinom, inhibitorni učinak je bio sličan onom od TAK-779-a. Na taj način vezanjem neaktivne male molekule za zlatne nanočestice pripravljene su multivalentne zlatne nanočestice kao učinkoviti terapeutici (Slika 15) (Bowman i sur., 2008).



Slika 15. Struktura (SDC- 1721)- zlatne nanočestice (prilagođeno iz : Bowman i sur., 2008).

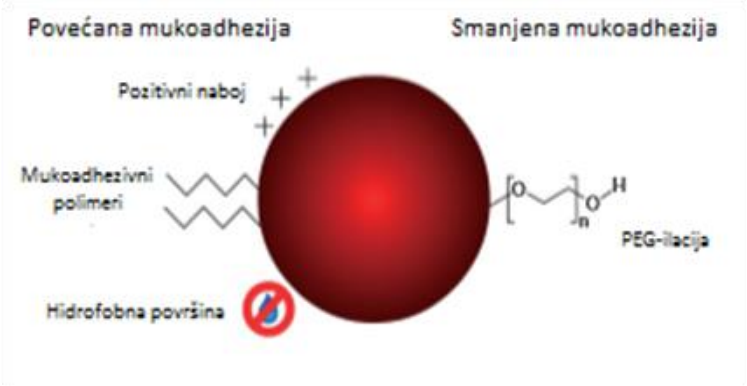
Druga vrsta anorganskih nanočestica koje su istraživane u anti-HIV terapiji su srebrne nanočestice. Njihovim oblaganjem sa polivinilpirolidonom (engl. *polyvinylpyrrolidone*, PVP) Lara i sur. (2010) su pripravili nanočestice koje su učinkovite u sprječavanju prijenosa HIV-a i to u koncentracijama netoksičnim za vaginalne stanice. PVP- srebrne nanočestice su inhibirale fuziju ili ulazak virusa u stanicu domaćina sprječavanjem interakcije između gp-120 (ligand koji se nalazi na HIV-1) i CD4 receptora na stanici domaćina. PVP- srebrne nanočestice

uklopljene u Repelens® gel (vaginalni ovlaživač) su djelovanjem unutar jedne minute pokazale dobru zaštitu od prijenosa infekcije HIV-a. Osim toga, dugotrajna primjena pripravka tijekom 48 sati nije bila toksična za cervikalni epitel. Stanice su bile zaštićene od prijenosa virusa idućih 48 sati, čime je potvrđena sigurnost i učinkovitost pripravka.

4.9. MUKOADHEZIVNI I MUKO-PENETRIRAJUĆI NANOSUSTAVI

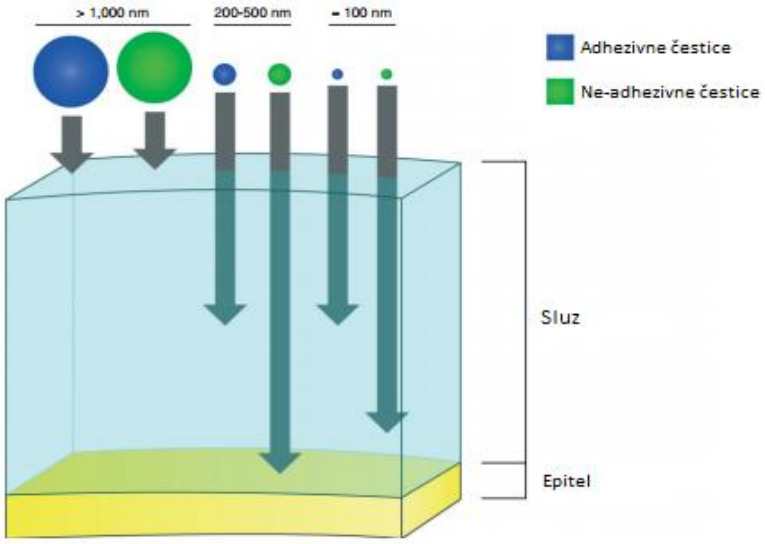
U novije vrijeme (zadnjih 5 godina) sve se više istražuje novi tip nanosustava za vaginalnu primjenu. Riječ je o nanočesticama obloženim inertnim polimerima, neutralnog naboja i hidrofilne površine sa sposobnošću penetracije kroz sluznicu (muko-penetrirajući nanosustavi). Velika je polemika u znanstvenoj zajednici o korištenju mukoadhezivnih i muko-penetrirajućih nanosustava. Zagovornici muko-penetrirajućih sustava ističu da su glavni nedostaci mukoadhezivnih nanosustava potencijalno oštećenje protektivne mikrostrukture sluzi i taj da ostaju „zarobljeni“ u gornjim slojevima sluzi te se zbog normalnog fiziološkog ispiranja površinskih slojeva sluzi (mukoze) uklanjaju zbog čega ne uspijevaju dostaviti lijek u niže slojeve do epitelnih stanica (Wang i sur., 2011; Cone, 2009; Lai i sur., 2007). Nadalje, mukoadhezivni nanosustavi nisu prikladni za dopremu lijekova koji svoju aktivnost postižu u stanici vaginalnog epitela, primjerice inhibitori reverzne transkriptaze (das Neves i sur., 2011a).

Koliko će koje čestice i koliko duboko penetrirati u/kroz sluz ovisi o njihovoj veličini i površinskim svojstvima (sastav i naboj) (Slika 16). Istraživanja su pokazala da će difuzija čestica veličina 200-500 nm (veće čestice) gusto pokrivenih sa polietilenglikolom (neutralne hidrofilne površine), kroz nerazrijeđenu humanu vaginalnu sluz biti puno brža od odgovarajućih čestica veličina od 100 nm (manje čestice). Budući da mukoza ima pore različitih veličina (heterogene je strukture), male čestice će ulaziti u male pore te će unutar njih biti zadržane. Za razliku od manjih čestica, velike čestice ne mogu ulaziti u manje pore nego u veće kanale kroz koje će puno brže prolaziti (Lai i sur., 2007).



Slika 16. Utjecaj površinskih svojstava nanočestice na mukoadheziju (prilagođeno iz: das Neves i sur., 2011a).

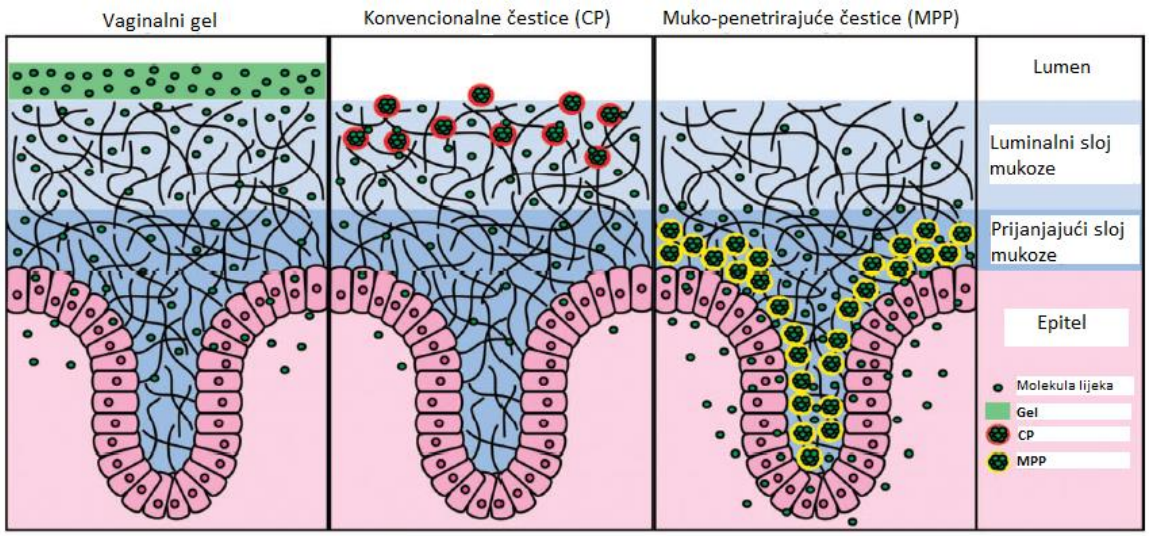
Istraživanje sa biorazgradivim PEG-iliranim PLGA nanočesticama neutralnih površina su pokazala da te čestice uspijevaju doći do stanica epitela, prolaze u submukoznu stromu (ispod epitela) te u stanice fibroblasta vaginalnog tkiva. Osim toga, ovo istraživanje je također pokazalo da veće neutralne čestice brže prolaze kroz mukozu do epitela od odgovarajućih manjih (Cu i sur., 2011). Godinu dana kasnije, Yu i sur. (2012) su pokazali da PEG-PLGA nanočestice veličine 100 nm brzo difundiraju kroz svježu, nerazrjeđenu cervikovaginalnu sluz te bi mogli biti nosači za vaginalnu primjenu lijekova. Utjecaj veličine nanočestica na penetraciju u/kroz sluz prikazana je shematski na Slici 17.



Slika 17. Shematski prikaz relativne sposobnosti difuzije nanočestica kroz sluz s obzirom na veličinu i svojstva površine (das Neves i sur., 2011a).

Razumijevanje mehanizma kojim zdrava sluz spriječava virusnu infekciju može značajno unaprijediti prevenciju i liječenje spolno prenosivih bolesti. Dugi niz godina je u znanstvenoj zajednici bilo općenito prihvaćeno da sluz spriječava penetraciju virusa do epitelnih stanica steričkom interakcijom (opstrukcijom) između vlakana mucina i virusa. Drugim riječima, samo oni virusi čija je veličina manja od pora sluzi će penetrirati kroz pore do epitelnih stanica i uzrokovati infekciju. U prilog ovakvom razmatranju išli su rezultati istraživanja koji su pokazali da male čestice nalik virusu koje se sastoje od kapside Norwalk virusa (38 nm) i HPV (55 nm) prolaze kroz sluz jednako brzo kao i kroz vodu dok veći virus HSV (180 nm) prolazi znatno sporije. Zbog pretpostavke da je HSV zaustavljen steričkom opstrukcijom, znanstvenici su zaključili da je prosječna veličina pora sluzi otprilike 100 nm. Kako bi opovrgnuli ovakav mehanizam protektivnog djelovanja sluzi, Lai i sur. (2010) su istražili veličinu pora. Istraživanje su proveli koristeći muko-penetrirajuće čestice jer one ne utječu na stvarnu veličinu pora (nema interakcije sa vlaknima mucina). Iznenađujuće, rezultati istraživanja su pokazali da je prosječna veličina pora sluzi 340 ±70 nm što je veće od ljudskih virusa. Prema tome, Lai i sur. (2010) su zaključili da se protektivni mehanizam kojim je virus zaustavljen u penetraciji do epitelnih stanica (infekciji) odvija djelovanjem adhezivnih sila između vlakana mucina i virusa a ne zbog nemogućnosti ulaska virusa u pore sluzi. Također, pokazali su da HPV (55 nm) i manji virusi (ranije spomenuti) prolaze kroz sluz jednako brzo kao i kroz vodu jer su ove čestice dovoljno male da uđu u velike pore sluzi unutar kojih nisu zaustavljene adhezivnim silama jer imaju neutralnu i minimalno hidrofobnu površinu kojom ne prijanjaju za vlakna mucina. Ispitivanje penetracije HIV-a (120 nm) je također pokazalo da je difuzija virusa usporena zbog adhezivnih interakcija virusa sa vlaknima mucina, ali isključivo u kiselim uvjetima (pH 4) u kojima mliječna kiselina poništava negativni naboj na površini HIV-a bez razgradnje virusne ovojnice. U drugom ispitivanju sa kloridnom kiselinom pri istim uvjetima (pH 4) HIV nije bio zaustavljen adhezivnim silama između virusa i mucina jer kloridna kiselina nije poništila negativni naboj na površini HIV-a. Prema tome, mliječna kiselina, odnosno prisutni laktobacili imaju važnu ulogu u smanjenju prijenosa HIV-a spolnim putem. Nadalje, istraživanje je pokazalo da uslijed kratkotrajne neutralizacije sluzi spermom do otprilike pH 6-7, HIV zadržava negativni naboj i kreće se puno brže kroz sluz nego u kiselim uvjetima. Na temelju ovih rezultata, znanstvenici su zaključili da za učinkovitu zaštitu od infekcije HIV-om pripravak treba osigurati održavanje prirodnih uvjeta kiselosti (mliječna kiselina) jer bi na taj način HIV bi bio zaustavljen prije nego dođe do ciljanih stanica (Lai i sur., 2009).

Kako bi dobili čestice koje mogu penetrirati kroz sluz ali i osigurati produljeno oslobađanje lijeka, Ensign i sur. (2012b) su obložili PLGA i polistirenske nanočestice niskomolekularnim PEG-om. Rezultati su pokazali jednoliku raspodjelu u vaginalnom epitelu i brže kretanje kroz cervikovaginalnu sluz miša ako se čestice dopreme u hipotoničnoj otopini. Ensign i sur. (2012b) su pokazali da su muko-penetrirajuće čestice uspjele doći duboko u nabore rodnice (*rugae vaginales*) u roku od nekoliko minuta i zadržale su se tamo 24 h. S druge strane, neobložene, konvencionalne čestice su ostale zarobljene u gornjim slojevima mukoze i nisu mogle penetrirati do vaginalnog epitela (Slika 18). Prema tome, ovaj eksperiment je pokazao da su muko-penetrirajuće nanočestice, tj. PEG-PLGA nanočestice učinkoviti i sigurni nanosustavi za dopremu lijeka do vaginalnog epitela. Iako su potrebna daljna ispitivanja, muko-penetrirajuće čestice bi mogle znatno unaprijediti liječenje i prevenciju spolno prenosivih bolesti (Ensign i sur., 2012a).



engl. CP =*conventional particles*; MPP= *mucus-penetrating particles*

Slika 18. Shematski prikaz vaginalne dostave lijeka iz gela, konvencionalnih i muko-penetrirajućih čestica (Ensign i sur., 2012b)

5. ZAKLJUČCI

- Nanoterapeutici za lokalnu vaginalnu primjenu imaju značajan terapijski potencijal u odnosu na konvencionalne ljekovite oblike.
- Uklapanjem djelatne tvari u nanosustave odgovarajućih fizičko-kemijskih svojstava moguće je poboljšati topljivost slabo topljivih ljekovitih tvari, a time i njihovu bioraspoloživost.
- Primjena mukoadhezivnih terapijskih nanosustava omogućava dobru raspodjelu i optimalno zadržavanje ljekovite tvari unutar rodnice.
- Na penetraciju nanočestica kroz sluz do epitelnih stanica utječu površinska svojstva (polimeri, naboj, hidrofilnost) te veličina nanočestica.
- Uporabom muko-penetrirajućih nanočestica omogućena je doprema lijeka do epitelnih stanica.
- Različiti istraživani nanosustavi su pokazali veliki potencijal u prevenciji HIV infekcija i ostalih spolno prenosivih bolesti te u liječenju bakterijskih i gljivičnih oboljenja, posebice vaginalne kandidijaze.
- Od svih istraživanih nanosustava dendrimeri su pokazali najbolje rezultate na području vaginalne primjene mikrobicida i trenutno su u završnoj fazi kliničkih ispitivanja (Vivagel®, SPL7013 dendrimer u mukoadhezivnom gelu).
- Unatoč brojnim pozitivnim rezultatima pretkliničkih ispitivanja različitih vrsta nanočestica, njihovu učinkovitost, sigurnost i prihvatljivost od strane bolesnika potrebno je potvrditi kliničkim istraživanjima odnosno dugogodišnjom primjenom u praksi.

6. LITERATURA

Alexander NJ, Baker E, Kaptein M, Karck U, Miller L, Zampaglione E. Why consider vaginal drug administration? *Fertil Steril*, 2004, 82, 1-12.

Alukda D, Sturgis T, Youan BBC. Formulation of tenofovir-loaded functionalized solid lipid nanoparticles intended for HIV prevention. *J Pharm Sci*, 2011, 100, 3345–3356.

Andrews GP, Donnelly L, Jones DS, Curran RM, Morrow RJ, Woolfson AD, Malcolm RK. Characterization of the rheological, mucoadhesive, and drug release properties of highly structured gel platforms for intravaginal drug delivery. *Biomacromolecules*, 2009, 10, 2427–2435.

Ashok V, Manoj Kumar R, Murali D, Chatterjee A. A review on vaginal route as a systemic drug delivery. *Critical review in pharmaceutical sciences*, 2012, 1, 1-19.

Azeem A, Anwer MK, Talegaonkar S. Niosomes in sustained and targeted drug delivery: some recent advances. *J Drug Target*, 2009, 17, 671–689.

Bachhav YG, Patravale VB. Microemulsion-based vaginal gel of clotrimazole: formulation, in vitro evaluation and stability studies. *AAPS PharmSciTech*, 2009, 10, 476–481.

Barbaro G, Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT. Highly Active Antiretroviral Therapy: Current State of the Art, New Agents and Their Pharmacological Interactions Useful for Improving Therapeutic Outcome. *Curr Pharm Des*, 2005, 11, 1805-1843.

Basnet P, Hussain H, Tho I, Škalko-Basnet N. Liposomal delivery system enhances anti-inflammatory properties of curcumin. *J Pharm Sci*, 2012, 101, 598– 608.

Bawarski WE, Chidlowsky E, Bharali DJ, Mousa SA, Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine: NBM*, 2008, 4, 273-282.

Berginc K, Škalko-Basnet N, Basnet P, Kristl A. Development and evaluation of an in vitro vaginal model for assessment of drug's biopharmaceutical properties: curcumin. *AAPS PharmSciTech*, 2012, 13, 1045–1053.

Bernstein DI, Stanberry LR, Sacks S, Ayisi NK, Gong YH, Ireland J, Mumper RJ, Holan G, Matthews B, McCarthy T, Bourne N. Evaluations of unformulated and formulated dendrimer-

based microbicide candidates in mouse and guinea pigs model of genital herpes. *Antimicrob Agents Chemother*., 2003, 47, 3784–3788.

Bilensoy E, Rouf MA, Vural I, Şen M, Hincal A. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole:b-cyclodextrin complex. *AAPS PharmSciTech*, 2006, 7, E1–E7.

Bourne N, Stanberry LR, Kern ER, Holan G, Matthews B, Bernstein DI. Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against herpes simplex virus infections. *Antmicrob Agents Chemother*., 2000, 44, 2471–2474.

Bowman MC, Ballard TE, Ackerson CJ, Feldheim DL, Margolis DM, Melander C. Inhibition of HIV Fusion with Multivalent Gold Nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 2008, 130, 6896–6897.

Cal K, Centkowska K. Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68, 467–478.

Calabretta MK, Kumar A, McDermott AM,Cai C.Antibacterialactivitiesof poly(amidoamine) dendrimers terminated with amino and poly(ethylene glycol) groups. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 1807–1811.

Caron M, Besson G, Etenna SLD, Mintsa-Ndong A, Mourtas S, Radaelli A, De Giuli Morghen C, Loddo R, La Colla P, Antimisiaris SG, Kazanji M. Protective properties of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (MC1220) incorporated into liposome against intravaginal challenge of Rhesus Macaques with RT-SHIV. *Virology*, 2010, 405, 225–233.

Chen MY, Millwood IY, Wand H, Poyton M, Law M, Kaldor JM, Wesselingh S, Price CF, Clark LJ, Paull JRA, Fairley CK. A randomized controlled trial of the safety of candidate microbicide SPL7013 gel when applied to the penis. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2009 50, 375–380.

Cheng Y, Qu H, Ma M, Xu Z, Xu P, Fang Y, Xu T. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as biocompatible carriers of quinolone antimicrobials: an in vitro study. *Eur J Med Chem*, 2007, 42, 1032–1038.

Chonco L, Pion M, Vacas E, Rasines B, Maly M, Serramia MJ, López-Fernández L, De la Mata J, Alvarez S, Gómez R, Muńoz-Fernández MA. Carbosilane dendrimer nanotechnology outlines of the broad HIV blocker profile. *J Control Release*, 2012, 161, 949–958.

Cohen CR, Brown J, Moscicki AB, Bukusi EA, Paull JRQ, Price CF, Shiboski S. A Phase I randomized placebo controlled trial of the safety of 3% SPL7013 gel (VivaGel®) in healthy young women administered twice daily for 14days. *PLOS One*, 2011, 6, e16258.

Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61, 75–85.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 2002, 420, 860–867.

Cristofaro P, Ramratnam B. RNAi tackles a sexually transmitted diseases. *Nat Biotechnol*, 2006, 24, 48–49.

Cu Y, Booth CJ, Saltzman WM. In vivo distribution of surface-modified PLGA nanoparticles following intravaginal delivery. *J Control Release*, 2011, 156, 258–264.

das Neves J, Amiji M, Bahia MF, Sarmento B. Assessing the physical-chemical properties and stability of dapivirine-loaded polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, 2013, 18, 307-314.

das Neves J, Amiji M, Sarmento B. Mucoadhesive nanosystems for vaginal microbicide development: friend or foe? .*Wiley Interdiscipl. Rev.: Nanomed Nanobiotechnol*, 2011a, 3, 389–399.

das Neves J, Araújo F, Andrade F, Amiji M, Bahia MF, Sarmento B. Biodistribution and pharmacokinetics of dapivirine-loaded nanoparticles after vaginal delivery in mice. *Pharm Res*, 2014a, 31, 1834-1845.

das Neves J, Araújo F, Andrade F, Michiels J, Ariën KK, Vanham G, Amiji M, Bahia MF, Sarmento B. In vitro and ex vivo evaluation of polymeric nanoparticles for vaginal and rectal delivery of the anti-HIV drug dapivirine. *Mol Pharm*, 2014b, 10, 2793-2807.

das Neves J, Bahia MF. Gels as vaginal drug delivery systems. *Int J Pharm*, 2006, 318, 1-14.

das Neves J, Bahia MF, Amiji MM, Sarmento B. Mucoadhesive nanomedicine: characterization and modulation of mucoadhesion at the nanoscale. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011b, 8, 1085–1104.

das Neves J, Michiels J, Ariën KK, Vanham G, Amiji M, Bahia MF, Sarmento B. Polymeric nanoparticles affect the intracellular delivery, antiretroviral activity and cytotoxicity of the microbicide drug candidate dapivirine. *Pharm Res*, 2012, 29, 1468-1484.

D'Cruz OJ, Uckun FM. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. *Contraception*, 2001, 64, 113–123.

Devarajan V, Ravichandran V. Nanoemulsions: as modified drug delivery tool. *Pharmacie Globale© (IJCP)*, 2011, 2, 1-6.

Dittgen M, Durrani M, Lehmann K. Acrylic polymers: a review of pharmaceutical applications. *STP Pharm Sci*, 1997, 7, 403–437.

du Toit LC, Pillay V, Choonara YE. Nano-microbicides: challenges in drug delivery, patient ethics and intellectual property in the war against HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev* , 2010, 62, 532–546.

Ensign LM, Schneider C, Suk JS, Cone R, Hanes J. Mucus penetrating nanoparticles: biophysical tool and method of drug and gene delivery. *Adv Mater*, 2012a, 24, 3887–3894.

Ensign LM, Tang BC, Wang YY, Tse TA, Hoen T, Cone R, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for vaginal drug delivery protect against herpes simplex virus. *Sci Transl Med*, 2012b, 4, 1-10. 138ra79.

Ferguson LM, Rohan LC. The importance of the vaginal delivery route for antiretrovirals in HIV prevention.*Ther Deliv*, 2011, 2, 1535–1550.

Fichorova RN, Zhou F, Ratnam V, Atanassova V, Jiang S, Strick N, Neurath AR. Anti-human immunodeficiency virus type 1 microbicide cellulose acetate 1,2-benzendicaroxylate in a human in vitro model of vaginal inflammation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49, 323–335.

Foldvari M. Effect of vehicle on topical liposomal drug delivery: petrolatum bases. *J Microencapsul*, 1996, 13, 589–600.

Foldvari M, Moreland A. Clinical observations with topical liposome-encapsulated interferon alpha for the treatment of genital papilloma virus infections. *J Liposome Res*, 1997, 7, 115–126.

Francois M, Snoeckx E, Putteman P, Wouters F, De Proost E, Delaet U, Peeters J, Brewster ME. A mucoadhesive, cyclodextrin-based vaginal cream formulation of itraconazole. *AAPS PharmSciTech*, 2003, 5, 1–5.

Gong E, Matthews B, McCarthy T, Chu J, Holan G, Raff J, Sacks S. Evaluation of dendrimer SPL7013, a lead microbicide candidate against herpes simplex viruses. *Antviral Res*, 2005, 68, 139–146.

Ham AS, Cost MR, Sassi AB, Dezzutti CS, Rohan LC. Targeted delivery of PSC-RANTES for HIV-1 prevention using biodegradable nanoparticles. *Pharm Res*, 2009, 26, 502-511.

Harms M, Müller-Goymann CC. Solid lipid nanoparticles for drug delivery. *J Drug Del Sci Tech*, 2011, 21, 89-99.

Jain SK, Singh R, Sahu B. Development of a liposomes based contraceptive system for intravaginal administration of progesterone. *Drug Dev Ind Pharm*, 1997, 23, 827–830.

Janiszewska J, Sowińska M, Rajnisz A, Solecka J, Łącka I, Milewski S, Urbańczyk-Lipkowska Z. Novel dendrimeric lipopeptides with antifungal activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22, 1388–1393.

Jhaveri AM, Torchilin VP. Multifunctional polymeric micelles. *Front Pharmacol*, 2014, 5, 1-26.

Jiang YH, Emau P, Cairns JS, Flanary L, Morton WR, McCarthy TD, Tsai CC. SPL7013 gel as a topical microbicide for prevention of vaginal transmission of SHIV89.6P in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2005, 21, 207– 213.

Kale VV, Ubgade A. Vaginal mucosa-a promising site for drug therapy, *Br J Pharm Res*, 2013, 3, 983-1000.

Kent HL. Epidemiology of vaginitis. *Am J Obstet Gynecol*, 1991, 165, 1168-1176.

Kish-Catalone T, Pal R, Parrish J, Rose N, Hocker L, Hudacik L, Reitz M, Gallo R, DeVico A. Evaluation of -2 RANTES vaginal microbicide formulations in a nonhuman primate simian/human immunodeficiency virus (SHIV) challenge model. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2007, 23, 33–42.

Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 75, 1–18.

Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S, Man ST, Wang YY, Cone R, Hanes J. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 1482–1487.

Lai SK, Hida K, Shukair S, Wang YY, Figueiredo A, Cone R, Hope TJ, Hanes J. Human immunodeficiency virus type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. *J Virol*, 2009, 83, 11196–11200.

Lai SK, Wang YY, Hida K, Cone R, Hanes J. Nanoparticles reveal that human cervicovaginal mucus is riddled with pores larger than viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 12, 598–603.

Lara HH, Ixtepan-Turrent L, Garza-Treviño EN, Rodriguez-Padilla C. PVP- coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. *J. Nanobiotechnology*, 2010, 8, 1-11.

Lembo D, Cavalli R. Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. *Antivir Chem Chemother*, 2010, 21, 53–70.

Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm*, 2008, 5, 496–504.

O'Loughlin J, Millwood IY, McDonald HM, Price CF, Kaldor JM, Paul JRA. Safety, tolerability and pharmacokinetics of SPL7013 gel (VivaGel): a dose ranging, Phase I study. *Sex Transm Dis*, 2010, 37, 100–104.

Luganini A, Nicoletto SF, Pizzuto L, Pirri G, Giuliani A, Landolfo S, Gribaudo G. Inhibition of herpes simplex virus type 1 and type 2 infections by peptide-derivatized dendrimers. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55, 3231– 3239.

Mahajan SD, Aalinkeel R, Law WC, Reynolds JL, Nair BB, Sykes DE, Yong KT, Roy I, Prasad PN, Schwartz SA. Anti-HIV-1 nanotherapeutics: promises and challenges for the future. *Int J Nanomed*, 2012, 7, 5301–5314.

Martins CVB, da Silva DL, Neres ATM, Magalhaes TFF, Watanabe GA, Modolo LV, Sabino AA, de Fatima A, de Resende MA. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63, 337–339.

Mandić N, Vanić Ž, Filipović-Grčić J. Liposomi s kalceinom: odabir optimalne metode priprave. *Farm Glasnik*, 2012, 68, 697-708.

McGill SL, Smyth HDC, Disruption of the mucus barrier by topically applied expgenous particles. *Mol Pharm*, 2010, 7, 2280–2288.

McCarthy TD, Karellas P, Henderson SA, Giannis M, O'Keefe DF, Heery G, Paull JRA, Matthews BR, Holan G.Dendrimersasdrugs:discoveryand preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention. *Mol Pharm*, 2005, 2, 312–318.

Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles.Production, characterization and applications. *Adv Drug Deliver Rev*, 2001, 47, 165 –196.

Meng J, Sturgis TF, Youan BBC. Engineering tenofovir loaded chitosan nanoparticles to maximize microbicide mucoadhesion. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 44, 57-67.

Microemulsion, http://www.quazoo.com/q/Microemulsion , pristupljeno 8.5.2015.

Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles – a review. *Trop J Pharm Res*, 2006, 5, 561– 573.

Mourtas S, Mao J, Parsy CC, Storer R, Klepetsanis P, Antimisiaris SG. Liposomal gels for vaginal delivery of the microbicide MC-1220: preparation and in vivo vaginal toxicity and pharmacokinetics. *Nano LIFE*, 2010, 1, 195–205.

Müller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59, 522-530.

Mumper RJ, Bell MA, Worthen DR, Cone RA, Lewis GR, Paull JRA, Moench TR. Formulating a sulfonated antiviral dendrimer in a vaginal microbicidal gel having dual mechanism of action. *Drug Dev Ind Pharm*, 2009, 35, 515–524.

Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery, http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/47025.pdf , pristupljeno 14.5.2015.

Navath RS, Menjoge AR, Dai H, Romero R, Kannan S, Kannan RM. Injectable PAMAM dendrimer–PEG hydrogels for the treatment of genital infections: formulation and in vitro and in vivo evaluation. *Mol Pharm*, 2011, 8, 1209–1223.

Ning MY, Guo YZ, Pan HZ, Yu HM, Gu ZW. Preparation and evaluation of proliposomes containing clotrimazole. *Chem Pharm Bull*, 2005a, 53, 620–624.

Ning M, Guo Y, Pan H, Chen X, Gu Z. Preparation, in vitro and in vivo evaluation of liposomal/niosomal gel delivery systems for clotrimazole. *Drug Dev Ind Pharm*, 2005b, 31, 375–383.

Omar RF, Bergeron MG. The future of microbicides. *J Infect Dis*, 2011, 15, 3656–3660.

Patel GM, Patel PV. Novel vaginal anti-HIV drug delivery system of tenofovir disoproxil fumarate. *Am J PharmTech Res*., 2011, 1, 366–383.

Patton DL, Cosgrove Sweeney YT, McCarthy TD, Hillier SL. Preclinical safety and efficacy assessments of dendrimer-based (SPL7013) microbicide gel formulations in a nonhuman primate model. *Antimicrob Agents Chemother*., 2006, 50, 1696–1700.

Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Jalšenjak I. Liposomes for treatment of vaginal infections. *Eur J Pharm Sci*, 1999, 8, 345–351.

Pavelic Ž, Škalko-Basnet N, Schubert R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. *Int J Pharm*, 2001, 219, 139–149.

Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Jalšenjak I. Liposomal gel with chloramphenicol: characterization and in vitro release. *Acta Pharm*, 2004a, 54, 319– 330.

Pavelic Ž, Škalko-Basnet N, Schubert R, Jalšenjak I. Liposomal gels for vaginal drug delivery. *Method Enzymol*, 2004b, 387, 287–299.

Pavelić Ž, Škalko-Basnet, N., Filipović-Grčić J, Martinac A, Jalšenjak I. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *J Control Release*, 2005a, 106, 34–43.

Pavelić Ž, Škalko-Basnet N, Jalšenjak I. Characterisation and in vitro evaluation of bioadhesive liposome gels for the local treatment of vaginitis. *Int J Pharm*, 2005b, 301, 140–148.

Pavelić Ž. Terapijski sustavi za vaginalnu primjenu, *Farm Glasnik*, 2005, 61, 441-453.

Peppas NA, Huang Y, Nanoscale technology of mucoadhesive interactions, *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56, 1675–1687.

Price CF, Tyssen D, Sonza S, Davie A, Evans S, Lewis GR, Xia S, Spelman T, Hodsman P, Moench TR, Humberstone A, Paull JRA, Tachedjian G. SPL7013 gel (VivaGel®) retains potent HIV-1 and HSV-2 inhibitory activity following vaginal administration in humans. *PLoS One*, 2011, 6, e24095.

Ravani L, Esposito E, Bories C, Lievin-Le Moal V, Loiseau PM, Djabourov M, Cortesi R, Bouchemal K. Clotrimazole loaded nanostructured lipid carrier hydrogels: thermal analysis and in vitro studies. *Int J Pharm*, 2013, 454, 695-702.

Rojo J, Delgado R. Dendrimers and dendritic polymers as anti-infective agents: new antimicrobial strategies for therapeutic drugs. *Anti-Infective Agents Med Chem*, 2007, 6, 151–174.

Role of nanotechnology in developing antiviral agents, http://www.nanoviricides.com/Antiviral_Therapeutics_technologies_markets_and_companies_January_2008.pdf , pristupljeno 7.5.2015.

Rosa Borges A, Schengrund CL. Dendrimers and antivirals: a review. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 2005, 5, 247–254.

Rupp R, Rosenthal SL, Stanberry LR. VivaGel™ (SPL7013 gel): a candidate dendrimer-microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *Int J Nanomed*, 2007, 2, 561–566.

Sankhyan A, Pawar P. Recent trends in niosomes as vesicular drug delivery system. *J Appl Pharm Sci*, 2012, 2, 20–32.

Steinbach JM, Weller CE, Booth CJ, Saltzman WM. Polymer nanoparticles encapsulating siRNA for treatment of HSV-2 genital infection. *J Control Release*, 2012, 162, 102-110.

Svenson S,Tomalia DA. Dendrimersinbiomedicalapplications–reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 2106–2129.

Škalko N, Čajkovac M, Jalšenjak I. Liposomes with metronidazole for topical use: the choice of preparation method and vehicle. *J Liposome Res*, 1998, 8, 283–293.

Tulu M, Aghatabay NM, Senel M, Dizman C, Parali T, Dulger B. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of water soluble dendritic macromolecules. *Eur J Med Chem*, 2009, 44, 1093–1099.

Tyssen D, Henderson SA, Johnson A, Sterjovski J, Moore K, La J, Zanin M, Sonza S, Karellas P, Giannis MP, Krippner G, Wesselingh S, McCarthy T, Gorry PR, Ramsland PA, Cone R, Paull JRA, Lewis GR, Tachedjian G. Structure activity relationship of dendrimer microbicides with dual action antiviral activity. *PLoS One*, 2010, 5, e12309.

Valenta C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 1692-1712.

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija. *Farm Glasnik*, 2012, 68, 391-400.

Vanic Ž, Hafner A, Bego M, Škalko-Basnet N. Characterization of various deformable liposomes with metronidazole. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39, 481–488.

Vanić Ž, Palac Z, Škalko- Basnet N. Hidrogelovi za vaginalnu primjenu lijekova. *Farm Glasnik*, 2014, 70, 813-826.

Vanić Ž, Škalko-Basnet N. Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: Can they deliver?. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 50, 29–41.

Vanić Ž, Škalko-Basnet N. Mucosal nanosystems for improved topical drug delivery: vaginal route of administration. *J Drug Del Sci Tech*, 2014, 24, 435-444.

Wang L, Beumer Sassi A, Patton D, Isaacs C, Moncla BJ, Gupta P, Rohan LC. Development of a liposome microbicide formulation for vaginal delivery of octylgycerol for HIV prevention. *Drug Dev Ind Pharm*, 2012, 38, 995–1007.

Wang B, Navath RS, Menjoge AR, Balakrishnan B, Bellair R, Dai H, Romero R, Kannan S, Kannan RM. Inhibition of bacterial growth and intramniotic infection in a guinea pig model of chorioamnionitis using PAMAM dendrimers. *Int J Pharm*, 2010, 395, 298–308.

Wang YY, Lai SK, So C, Schneider C, Cone R, Hanes J. Mucoadhesive nanoparticles may disrupt the protective human mucus barrier by altering its microstructure. *PLoS One*, 2011, 6, e21547.

Woolfson AD, Malcolm RK, Gallagher R. Drug delivery by the intravaginal route. Crit Rev *Ther Drug Carrier Syst*, 2000, 17, 509-555.

Woodrow KA, Cu Y, Booth CJ, Saucier-Sawyer JK, Wood MJ, Saltzman WM. Intravaginal gene silencing using biodegradable polymer nanoparticles densely loaded with smallinterfering RNA. *Nat Mater*, 2009, 8, 526-533.

Wu SY, Chang HI, Burgess M, McMillan NAJ. Vaginal delivery of siRNA using a novel PEGylated lipoplex-entrapped alginate scaffold system. *J Control Release*, 2011, 155, 418–426.

Yang H, Parniak A, Isaacs CE, Hillier SL, Rohan LC. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes of the anti-HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor UC781. *AAPS J*, 2008, 10, 606–613.

Yang M, Yu T, Wang YY, Lai SK, Zeng Q, Miao B, Tang BC, Simons BW, Ensign LM, Liu G, Chan KW, Juang CY, Mert O, Wood J, Fu J, McMahon MT, Wu TC, Hung CF, Hanes J. Vaginal delivery of paclitaxel via nanoparticles with non-mucoadhesive surfaces suppresses cervical tumor growth. *Adv Healthc Mater*, 2014, 3, 1044-1052.

Yoo JW, Giri N, Lee CH. pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery. *Int J Pharm*, 2011, 403, 262-267.

Yu T, Wang YY, Yang M, Schneider C, Zhong W, Pulicare S, Choi WJ, Mert O, Fu J, Lai SK, Hanes J. Biodegradable mucus-penetrating nanoparticles composed of diblock copolymers of polyethylene glycol and poly(lactic-co-glycolic acid). *Drug Deliv Transl Res*, 2012, 2, 124–128.

7. SAŽETAK

Nanoterapeutici za vaginalnu primjenu

Vaginalni put primjene lijekova je od velike važnosti u lokalnoj terapiji i prevenciji infektivnih oboljenja. Konvencionalni ljekoviti oblici (kreme, gelovi, tablete) dostupni na tržištu nisu se uvijek pokazali dovoljno učinkovitima uslijed kratkog vremena zadržavanja pripravka na vaginalnoj sluznici. Nedostaci postojećih pripravaka nastoje se nadvladati uklapanjem lijekova u različite nanosustave (nanoterapeutike). Riječ je o različitim vrstama nanočestica veličine manje od 1 μm kod kojih je lijek uklopljen, dispergiran ili vezan za površinu. Primjenom nanosustava odgovarajućih fizičko-kemijskih svojstava moguće je: povećati topljivost teško topljivih lijekova, spriječiti razgradnju osjetljivih lijekova, poboljšati permeabilnost i transport slabo permeabilnih lijekova te na taj način omogućiti odgođenu, kontroliranu ili ciljanu dostavu lijeka. Uklapanjem lijeka u muko-penetrirajuće nanočestice moguće je postići produljeno oslobađanje te uspješnu dopremu lijeka do epitelnih stanica. Za postizanje željenog terapijskog učinka potrebno je postići dobro uklapanje lijeka u nosač, ali i osigurati stabilnost i viskoznost cijelog pripravka (umiješavanjem nanoterapeutika u odgovarajuće podloge). Nanosustavi su pokazali dobar potencijal u prevenciji virusnih infekcija i liječenju bakterijskih i gljivičnih oboljenja. Od svih ispitivanih nanosustava dendrimeri (SPL7013 dendrimer) su pokazali najbolje rezultate i trenutno su u završnim fazama kliničkih ispitivanja. Unatoč brojnim pozitivnim rezultatima pretkliničkih istraživanja različitih tipova nanočestica (lipidne i polimerne), njihovu djelotvornost, sigurnost i prihvatljivost od strane bolesnika potrebno je potvrditi kliničkim istraživanjima i dugogodišnjom primjenom u praksi.

8. SUMMARY

Nanopharmaceuticals for topical vaginal therapy

Vaginal drug delivery is of great importance in prevention and treatments of local infectious diseases. Conventional dosage forms (creams, gels, tablets) available on the market often prove to be ineffective as a result of their limited retention in the vagina. To overcome these disadvantages novel drug delivery nanosystems (nanopharmaceuticals) have been investigated. They include differrent types of nanoparticles less than 1 micron in which the drug is incorporated, dispersed or bound to the surface. Through the application of nanosystems with appropriate physical and chemical properties it is possible to: increase solubility of poorly soluble drugs, prevent degradation of unstable drugs, improve permeability and transport of poorly permeable drugs, thus allowing sustained, controlled or targeted drug delivery. By incorporating drug into the mucus-penetrating nanoparticles it is possible to provide successful drug delivery through the mucus to the epithelial cells. Achieving the desired therapeutic effect requires good encapsulation of the drug into the carrier, as well as ensuring stability and viscosity of the entire formulation (by incorporating nanopharmaceuticals into appropriate vehicles). Nanopharmaceuticals have shown a good potential in the prevention of viral infections and the treatment of bacterial and fungal diseases. The best results have been shown with polyanionic dendrimers (SPL7013 dendrimer) incorporated into mucoadhesive carbopol gels (Vivagel®). This formulation is currently in the final stages of clinical trials. Despite the many positive outcomes of preclinical studies of different types of nanoparticles (lipid and polymer), their effectiveness, safety and patient compliance need to be confirmed through further clinical trials and long-term application.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

NANOTERAPEUTICI ZA VAGINALNU PRIMJENU

Farah Khaznadar

SAŽETAK

Vaginalni put primjene lijekova je od velike važnosti u lokalnoj terapiji i prevenciji infektivnih oboljenja. Konvencionalni ljekoviti oblici (kreme, gelovi, tablete) dostupni na tržištu nisu se uvijek pokazali dovoljno učinkovitima uslijed kratkog vremena zadržavanja pripravka na vaginalnoj sluznici. Nedostaci postojećih pripravaka nastoje se nadvladati uklapanjem lijekova u različite nanosustave (nanoterapeutike). Riječ je o različitim vrstama nanočestica veličine manje od 1 μm kod kojih je lijek uklopljen, dispergiran ili vezan za površinu. Primjenom nanosustava odgovarajućih fizičko-kemijskih svojstava moguće je: povećati topljivost teško topljivih lijekova, spriječiti razgradnju osjetljivih lijekova, poboljšati permeabilnost i transport slabo permeabilnih lijekova te na taj način omogućiti odgođenu, kontroliranu ili ciljanu dostavu lijeka. Uklapanjem lijeka u muko-penetrirajuće nanočestice moguće je postići produljeno oslobađanje te uspješnu dopremu lijeka do epitelnih stanica. Za postizanje željenog terapijskog učinka potrebno je postići dobro uklapanje lijeka u nosač, ali i osigurati stabilnost i viskoznost cijelog pripravka (umiješavanjem nanoterapeutika u odgovarajuće podloge). Nanosustavi su pokazali dobar potencijal u prevenciji virusnih infekcija i liječenju bakterijskih i gljivičnih oboljenja. Od svih ispitivanih nanosustava dendrimeri (SPL7013 dendrimer) su pokazali najbolje rezultate i trenutno su u završnim fazama kliničkih ispitivanja. Unatoč brojnim pozitivnim rezultatima pretkliničkih istraživanja različitih tipova nanočestica (lipidne i polimerne), njihovu djelotvornost, sigurnost i prihvatljivost od strane bolesnika potrebno je potvrditi kliničkim istraživanjima i dugogodišnjom primjenom u praksi.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 49 stranica, 18 grafičkih prikaza, 3 tablice i 117 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: lokalna vaginalna terapija, liposomi, niosomi, lipidne nanočestice, polimerne nanočestice, dendrimeri, muko-penetrirajuće nanočestice, mukoadhezija

Mentor: **Dr. sc. Željka Vanić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vanić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Jasmina Lovrić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Roberta Petlevski, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagrebu
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

NANOPHARMACEUTICALS FOR TOPICAL VAGINAL THERAPY

Farah Khaznadar

SUMMARY

Vaginal drug delivery is of great importance in prevention and treatments of local infectious diseases. Conventional dosage forms (creams, gels, tablets) available on the market often prove to be ineffective as a result of their limited retention in the vagina. To overcome these disadvantages novel drug delivery nanosystems (nanopharmaceuticals) have been investigated. They include differrent types of nanoparticles less than 1 micron in which the drug is incorporated, dispersed or bound to the surface. Through the application of nanosystems with appropriate physical and chemical properties it is possible to: increase solubility of poorly soluble drugs, prevent degradation of unstable drugs, improve permeability and transport of poorly permeable drugs, thus allowing sustained, controlled or targeted drug delivery. By incorporating drug into the mucus-penetrating nanoparticles it is possible to provide successful drug delivery through the mucus to the epithelial cells. Achieving the desired therapeutic effect requires good encapsulation of the drug into the carrier, as well as ensuring stability and viscosity of the entire formulation (by incorporating nanopharmaceuticals into appropriate vehicles). Nanopharmaceuticals have shown a good potential in the prevention of viral infections and the treatment of bacterial and fungal diseases. The best results have been shown with polyanionic dendrimers (SPL7013 dendrimer) incorporated into mucoadhesive carbopol gels (Vivagel®). This formulation is currently in the final stages of clinical trials. Despite the many positive outcomes of preclinical studies of different types of nanoparticles (lipid and polymer), their effectiveness, safety and patient compliance need to be confirmed through further clinical trials and long-term application.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 49 pages, 18 figures, 3 tables and 117 references. Original is in Croatian language.

Keywords: topical vaginal therapy, liposomes, niosomes, lipid nanoparticles, polymeric nanoparticles, dendrimers, mucus-penetrating nanoparticles, mucoadhesion

Mentor: **Željka Vanić**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željka Vanić**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasmina Lovrić, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Roberta Petlevski, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2015.